

**UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI**

**Programa de Pós-Graduação em Química**

**Glauber Antônio dos Reis Andrade**

**DETERMINAÇÃO DA TEOFILINA, CLINDAMICINA, VARFARINA E  
VERAPAMIL POR AMPEROMETRIA PULSADA EM SISTEMA DE ANÁLISE  
POR INJEÇÃO EM BATELADA USANDO O ELETRODO DE DIAMANTE  
DOPADO COM BORO**

**DIAMANTINA - MG**

**2016**

**GLAUBER ANTÔNIO DOS REIS ANDRADE**

**DETERMINAÇÃO DA TEOFILINA, CLINDAMICINA, VARFARINA E  
VERAPAMIL POR AMPEROMETRIA PULSADA EM SISTEMA DE ANÁLISE  
POR INJEÇÃO EM BATELADA USANDO O ELETRODO DE DIAMANTE  
DOPADO COM BORO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos

DIAMANTINA – MG

2016

**DETERMINAÇÃO DA TEOFILINA, CLINDAMICINA, VARFARINA E  
VERAPAMIL POR AMPEROMETRIA PULSADA EM SISTEMA DE ANÁLISE  
POR INJEÇÃO EM BATELADA USANDO O ELETRODO DE DIAMANTE  
DOPADO COM BORO**

**GLAUBER ANTÔNIO DOS REIS ANDRADE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, nível de Mestrado, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

APROVADO EM 24/03/2016

Prof. Dr. Lucas Franco Ferreira – UFVJM  
Membro Interno

Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz – UFU  
Membro Externo

Prof. Dr. Wallans Torres Pio dos Santos – UFVJM  
Orientador e Presidente da Banca

**DIAMANTINA**

**2016**

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM  
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

A553d      Andrade, Glauber Antônio dos Reis  
              Determinação da teofilina, clindamicina, varfarina e verapamil por  
              amperometria pulsada em sistema de análise por injeção em batelada  
              usando o eletrodo de diamante dopado com boro / Glauber Antônio  
              dos Reis Andrade. – Diamantina, 2016.  
              79 p. : il.

              Orientador: Wallans Torres Pio dos Santos

              Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Química) -  
              Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.

              1. Fármacos de baixo índice terapêutico. 2. Amperometria de  
              múltiplos pulsos. 3. Análise por injeção em batelada. 4. Diamante  
              dopado com boro. 5. Controle de Qualidade de Fármacos.  
              I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e  
              Mucuri.

**CDD 543**

Elaborado com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

***“Deus não nos fez perfeitos e não escolhe os capacitados, capacita os escolhidos.”***  
**Albert Einstein**

## **AGRADECIMENTOS**

É preciso ter fé para alcançar os objetivos, agradeço a Deus.

Agradeço à minha família pelo apoio e amor incondicional, aos meus pais Zilda e Anselmo aos meus irmãos Rodrigo, Eron Diêgo, Anselmo Filho e Davi. Muito especiais.

Agradeço a minha noiva Patrícia pela paciência, companheirismo, amor e ajuda. Suportar a distância não é fácil.

Agradeço aos “Melhores amigos xotear” que tornou a distância da família menos dolorosa, a Daniel Carlos e Mateus pelo apoio e aconselhamentos. Muito obrigado.

Agradeço aos colegas do laboratório, Amanda, Debora, Fernando, Morgana e em especial o Tiago por toda a ajuda durante esse período.

Finalmente, agradeço ao meu professor e orientador Prof. Dr.: Wallans Torres Pio dos Santos pelos ensinamentos, pela paciência e toda a ajuda para o meu crescimento profissional.

## RESUMO

A Teofilina (TF), Clindamicina (CM), Varfarina (VF) e Verapamil (VP) são fármacos de baixo índice terapêutico que necessitam de um controle de qualidade rigoroso na elaboração de suas formulações. O desenvolvimento de métodos mais simples e rápidos para doseamento desses medicamentos é de grande interesse no setor farmacêutico. Neste sentido, o presente trabalho apresenta uma nova metodologia para determinação desses fármacos por amperometria de múltiplos pulsos (MPA) acoplada ao sistema de análise por injeção em batelada (BIA), utilizando o eletrodo de Diamante dopado com Boro (DDB). A análise em BIA foi realizada em uma célula eletroquímica do tipo Wall Jet, onde as injeções foram realizadas por meio de uma micropipeta automática ou, manualmente, por uma seringa descartável para TF, CM e VF, mostrando a possibilidade de diminuir custo do sistema de análise. O comportamento eletroquímico da TF, CM, VF e VP foi investigado por voltametria cíclica e os eletrólitos suportes escolhidos foram o ácido sulfúrico 0,1 mol L<sup>-1</sup>, tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0), tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0) com 10% de álcool etílico e ácido sulfúrico 0,2 mol L<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesses eletrólitos três fármacos apresentaram um único processo de oxidação: a TF em +1,33V, a CM em +1,18 V e a VF em +0,90 V. Já o VP apresentou três processos de oxidação entre +1,2V e +1,5V, além de um processo de redução em +0,2V depende das oxidações. A detecção MPA-BIA foi baseada na aplicação de um pulso de potencial de detecção e outro de limpeza do DDB para três fármacos. Neste caso, os pulsos de potencial para detecção da TF, CM e VF foram todos aplicados por 100ms em +1,5V, +1,6V e +1,2V, respectivamente. Para determinação do VP foram utilizados três pulsos de potencial, um para oxidação do VP (gerador) em +1,6V/50ms, um para redução do produto gerado (coletor) e quantificação do VP em -0,1V/30ms, e um terceiro em +1,1V/100ms para limpeza da superfície do DDB. A velocidade de injeção da MA foi otimizada em 100μL s<sup>-1</sup>, exceto para VP que foi de 47μLs<sup>-1</sup>, e com a SD a velocidade de injeção foi de aproximadamente 107 μLs<sup>-1</sup> pra a TF, CM e VF, proporcionando uma frequência analítica teórica de pelo menos 53 determinações por hora desses fármacos. Um baixo desvio padrão relativo (10 medidas) foi obtido para todos os fármacos, não ultrapassando 3,0% tanto pela injeção automática quanto pela manual. As curvas analíticas foram estabelecidas e uma boa faixa linear foi obtida para todos os fármacos com pelo menos duas ordens de concentração. Os coeficientes de correlação linear para todas as regressões foram maiores que 0,992 em todos os estudos. Os estudos de adição e recuperação mostraram valores próximos a 100 % para todas as amostras farmacêuticas analisadas. O método proposto usando a injeção automática e manual foi devidamente validado pelo método oficial para cada um dos fármacos avaliados. Portanto, a detecção MPA-BIA usando o eletrodo de DDB mostrou ser uma alternativa mais simples e rápida para determinação da TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas, possibilitando ainda uma diminuição do custo do sistema BIA pela substituição da micropipeta automática por uma seringa descartável.

**Palavras – Chave:** Fármacos de baixo índice terapêutico, Amperometria de Múltiplos Pulsos, Análise por Injeção em Batelada, Diamante Dopado com Boro, Controle de Qualidade de Fármacos.

## ASBTRACT

Theophylline (TF), Clindamycin (CM), Warfarin (VF) and Verapamil (VP) are drugs of narrow therapeutic index that require a strict quality control in the preparation of their formulations. Thus, the development of simple and rapid methods for determination of these drugs is very important in the pharmaceutical industry. In this sense, this paper presents a new methodology for determination of these drugs by multiple-pulse amperometry (MPA) coupled to batch injection analysis (BIA), using the boron-doped diamond (BDD) electrode. The analysis in BIA system was performed in an electrochemical cell (Wall Jet), where the injections were performed by automatic micropipette or manually by an disposable syringe for TF, CM and VF, showing a possibility to reduction of the analysis cost. The electrochemical behavior of the analytes was investigated by cyclic voltammetry and the support electrolytes were chosen for TF, CM, VF and VP in medium of sulfuric acid 0.1 mol L<sup>-1</sup>, phosphate buffer 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7.0), phosphate buffer 0.1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7.0) with 10% ethyl alcohol and sulfuric acid 0.2 mol L<sup>-1</sup>, respectively. In these conditions, three drugs exhibited a single oxidation process: TF in +1.33V, the CM in +1.18V and the VF in +0.90V (vs Ag/AgCl). Already the VP presented three oxidation processes between +1.2V and +1.5V, besides a reduction process in +0.20 V that depends on the oxidation. The MPA-BIA detection for three drugs (TF, CM, VF) was based on the application of two potential pulses, one for detection and other for cleaning BDD electrode. In this case, the potential pulses to detection the TF, CM and VF were all applied for 100ms at +1.5V, +1.2V and +1.6 V, respectively. In determination of the VP, were used three potential pulses, one for oxidation of VP (generator potential pulse) in +1.6V/50ms, one for reducing the generated product (collector potential pulse) and performed quantification of VP in -0.1V/30ms, and a third potential pulse at +1.1V/100ms for cleaning BDD electrode. The injection speed using automatic micropipette was 100μL s<sup>-1</sup>, except for VP that was 47μLs<sup>-1</sup>, and injection speed by insulin syringe was approximately 107μLs<sup>-1</sup>, which provide theoretical analytical frequency of at least 53 determinations per hour of these drugs. A low standard relative deviation (10 measures) was obtained for all drugs, not extending beyond 3.0% by both injections systems. The analytical curves were established and a good linear range was obtained for all drugs with at least two orders of concentration. The linear correlation coefficients for all regressions were higher than 0.992. The addition and recovery studies show values close to 100% for all drug samples analyzed. The proposed method using automatic and manual injection was validated by official method for each analyte. Therefore, this paper presented a fast and simple method for the determination of TF, CM, VF and VP in pharmaceutical formulations using BIA-MPA detection with BDD electrode. Moreover, this work demonstrated an inexpensive method for application in routine analysis of narrow therapeutic index drugs, mainly using a manual injection in BIA system by an disposable syringe.

**Keywords:** Narrow Therapeutic Index Drugs, Multiple Pulse Amperometry, Batch Injection Analysis, Boron-Doped Diamond Electrode, Drug-Quality Control.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1:</b> Representação esquemática de um experimento de Voltametria Cíclica. Ei: potencial inicial; Es: potencial de inversão; Ef: potencial final; ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência; EA: eletrodo auxiliar.....	19
<b>FIGURA 2:</b> Diagrama esquemático da célula BIA (Do Socorro Maia Quintino, 2003). (A) eletrodo de trabalho, (B) eletrodo auxiliar, (C) eletrodo de referência, (D) ponteira da micropipeta, (E) orifício para o preenchimento da célula, (F) barra de agitação, (G) dreno.....	21
<b>FIGURA 3:</b> Diagrama das etapas na aquisição do sinal do BIA (Do Socorro Maia Quintino, 2003). (A) antes da injeção, (B) transporte, (C) fim da injeção, (D) dispersão e (E) equilíbrio final.....	23
<b>FIGURA 4:</b> Fórmula estrutural da Teofilina.....	26
<b>FIGURA 5:</b> Fórmula estrutural da CM.....	30
<b>FIGURA 6:</b> Fórmula Estrutural da VF.....	32
<b>FIGURA 7:</b> Fórmula Estrutural do VP.....	34
<b>FIGURA 8:</b> Sistema BIA - (A) Célula eletroquímica com 3 eletrodos (referência, auxiliar e de trabalho) e o motor de agitação para análise por injeção em batelada (BIA); e em detalhe o eletrodo de DDB com a área delimitada por uma borracha de <i>o-ring</i> , (B) Micropipeta Automática Eppendorf Multipette com a ponteira de 1000 µL e (C) Seringa descartável 300µL.....	38
<b>FIGURA 9:</b> Voltamogramas Cíclicos em (A) do eletrólito H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,1 mol L <sup>-1</sup> (—) sem e com TF 1,0x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> sem tratamento (—), após tratamento catódico (—), e após tratamento anódico (—). Em (B) do eletrólito tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> em pH 7,0 (—), sem e com CM 1,0x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> sem tratamento (—), após tratamento catódico (—) e após tratamento anódico (—).Em (C) do eletrólito tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> em pH 7,0 e 10 % de álcool etílico (—), sem e com VF 1,0x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> sem tratamento (—), após tratamento catódico (—) e após tratamento anódico (—). Em (D) do eletrólito H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0,2 mol L <sup>-1</sup> (—), sem e com VP 1, 0 x 10 mol L <sup>-1</sup> sem tratamento (—), após tratamento catódico (—) e após tratamento anódico (—). Todos os voltamogramas dos respectivos fármacos foram obtidos com velocidade de varredura: 50 mV s <sup>-1</sup> .....	45
<b>FIGURA 10:</b> Reação de oxidação da TF. Fonte: (Spataru <i>et al.</i> , 2002).....	46
<b>FIGURA 11:</b> Reação de oxidação da VF. Fonte: (Gholivand, Torkashvand e Yavari,	

2015).....	47
<b>FIGURA 12:</b> Voltamogramas hidrodinâmicos para escolha dos potenciais obtidos pela detecção MPA, em (A) para oxidação da TF, em (B) para oxidação da CM, em (C) para oxidação da VF, em (D) para oxidação do VP e, posteriormente, estudo da potencial para redução do produto gerado do VP em 1,6 V (E). Os tempos de duração dos pulsos de potencial de oxidação foram fixados primeiramente em 100 ms para todos os estudos. Todos analitos foram realizadas em triplicata com soluções padrão dos analitos a $1,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ .....	48
<b>FIGURA 13:</b> Amperograma, Repetibilidade, (A) TF potencial de oxidação 1,5V/100 ms e limpeza 1,7V/100ms, (B) CM potencial de oxidação 1,6V/100ms e limpeza 0,5V/100ms, (C) VF potencial de oxidação 1,2V /100ms e limpeza -0,2V/100ms, (D) VP potencial de oxidação 1,6 V/50 ms, redução -0,1V/30 ms e limpeza 1,1V/100ms.....	52
<b>FIGURA 14:</b> BIAgrama com detecção MPA sob DDB das faixas lineares em (A) TF de $a= 1,0 \times 10^{-7}$ $r=1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , (B) CM de $a=1,0 \times 10^{-5}$ a $i=1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , (C) VF de $a= 8,0 \times 10^{-6}$ a $i=8,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ e em (D) VP de $a=1,0 \times 10^{-6}$ a $i=1,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ .....	53
<b>FIGURA 15:</b> Curvas de regressão linear provenientes dos amperogramas da Figura 14 dos fármacos (com os coeficientes de correlação lineares inseridos) em (A) para TF, (B) para CM, em (C) para VF e em (D) para a detecção do VP pelo potencial gerador e coletor.....	54
<b>FIGURA 16:</b> Gráfico das Razões entre os sinais (corrente) dos potenciais 1.7V e 1.5V versus as concentrações de TF de $4,0 \times 10^{-7}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	58
<b>FIGURA 17:</b> Voltamograma hidrodinâmico obtido por BIA-MPA sob eletrodo de BDD dos fármacos em (A) TF em meio de $\text{H}_2\text{SO}_4$ $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , (B) CM em meio de tampão fosfato (pH=7,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e em (C) VF em meio de tampão fosfato (pH=7,0) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 10% de álcool etílico. A concentração dos fármacos de $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em todos os casos.....	66
<b>FIGURA 18:</b> Amperograma obtido por BIA-MPA com injeção por uma seringa sob o eletrodo de BDD para 10 soluções padrão de (A) TF com potencial de oxidação 1,4V/50 ms e limpeza 1,7V/100ms, (B) CM potencial de oxidação 1,6V/50ms e limpeza 0,5V/100ms e (C) VF potencial de oxidação 1,2V/50ms e limpeza -0,2V/100ms .....	67
<b>FIGURA 19:</b> BIAgrama das faixas lineares em (A) TF de (a)= $1,0 \times 10^{-6}$ a (j)= $2,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , (B) CM de (a)= $8,0 \times 10^{-6}$ a (j)= $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$ , (C) VF de (a)= $2,0 \times 10^{-6}$ a (l)= $8,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ .....	68

**FIGURA 20:** Curvas de regressão linear provenientes dos estudos dos resultados obtidos pelo BÍograma da Figura 20 para cada fármaco. O coeficiente de correlação linear para cada curva está inserido nos gráfico..... 68

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> Propriedades Físico-Químicas da TF.....	26
<b>TABELA 2:</b> Métodos eletroquímicos para determinação da TF.....	28
<b>TABELA 3:</b> Propriedades Físico-Químicas da CM.....	30
<b>TABELA 4:</b> Propriedades Físico-Químicas da VF.....	32
<b>TABELA 5:</b> Propriedades Físico-Químicas do VP.....	34
<b>TABELA 6:</b> Métodos eletroquímicos para a determinação do VP.....	35
<b>TABELA 7:</b> Valores dos potenciais de limpeza dos fármacos TF, CM e VF, VP.....	51
<b>TABELA 8:</b> LD e LQ da TF, CM, VF e VP (para o potencial de oxidação (ox) e redução (re)).....	55
<b>TABELA 9:</b> Resultados do estudo de adição e recuperação dos fármacos TF, CM, VF e VP..	55
<b>TABELA 10:</b> Doseamento para a determinação de TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas pelo método proposto e pela metodologia oficial. Os valores após o $\pm$ são os desvio padrão da análise em triplicata de cada amostra.....	56
<b>TABELA 11:</b> Resultados dos testes F e t com intervalo de confiança de 95% para $n = 3$ .....	57
<b>TABELA 12:</b> Comparação das razões da média dos sinais nos potenciais 1,7V e 1,5V das soluções a $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de TFp, TFAm CM, PC, CO, AMI, TFCM e TFAA.....	58
<b>TABELA 13:</b> Comparação do método proposto com os métodos eletroquímicos reportados na literatura para a TF.....	60
<b>TABELA 14:</b> Comparação do método proposto com os métodos eletroquímicos reportados na literatura para a CM.....	62
<b>TABELA 15:</b> Comparação do método proposto com os métodos eletroquímicos reportados na literatura para a VF.....	63
<b>TABELA 16:</b> Comparação do método proposto com os métodos eletroquímicos reportados na literatura para o VP.....	64
<b>TABELA 17:</b> DPRs obtidos pela detecção BIA-MPA para injeção sequencial de 10 soluções padrão de cada Fármaco ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) com a micropipeta automática (MA) e com seringa insulina (SI).....	68
<b>TABELA 18:</b> Comparação do coeficiente angular da curva (B), R, LD, LQ e a faixa de trabalho (FT) obtidos com a MA com os da SI dos fármacos TF, CM e VF.....	69
<b>TABELA 19:</b> Resultados da adição e recuperação dos fármacos TF, CM e VF.....	70

<b>TABELA 20:</b> Resultados da comparação da metodologia proposta para a determinação de TF, CM e VF em formulações farmacêuticas com a metodologia oficial. Os valores após o $\pm$ são os desvio padrão da análise em triplicata de cada amostra.....	70
<b>TABELA 21:</b> Resultados dos testes F e t da TF, CM e VF.....	71

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido Ascórbico

Am+P – Solução Mistura

Am – Amostra

AMI – Aminofilina

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

B – Coeficiente angular da equação da reta de regressão linear

BIA – Análise com Injeção por Batelada

cAMP – Monofosfato Cíclico de Adenosina

cGMP – Monofostato Cíclico de Guanosina

GC– Cromatografia Gasosa (do inglês “*Gas Chromatography*”)

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CM – Clindamicina

CO – Colchicina

CVD – Deposição por Vapor Químico (do inglês “*Chemical Vapor Deposition*”)

CQ – Controle de Qualidade

DDB – Diamante Dopado com Boro

DE – Dose Efetiva

DL – Dose Letal

DPR – Desvio Padrão Relativo

EA – Eletrodo Auxiliar

ER – Eletrodo de Referência

ET – Eletrodo de Trabalho

DP – Desvio Padrão

E<sub>1</sub> – Pulso de Potencial de Limpeza

FIA – Análise por Injeção em Fluxo do inglês (do inglês “*Flow Injection Analysis*”)

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”)

HPHT- Alta Pressão / Alta Temperatura

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography - UV detection*” )

FLT – Faixa Linear de Trabalho

LD – Limite de Detecção

LQ – Limite de Quantificação

MA – Micropipeta Automática

MPA – Amperometria de Múltiplos Pulsos (do inglês “*Multiple Pulse Amperometry*”)

NIR – Reflectância no Infravermelho

PDE – Fosfodiesteres

PC – Paracetamol

R – Coeficiente de correlação linear

R% - Porcentagem de Recuperação

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

SAm+P – Sinal da Solução Mistura

SAM – Sinal da Amostra

SD – Seringa Descartável

SWV – Voltametria de Onda Quadrada (do inglês “*Square Wave Voltammetry*”)

TF – Teofilina

TFAA – Mistura de Teofilina com Ácido Ascórbico

TFAm – Amostra de Teofilina (formulação farmacêutica) VF – Varfarina

TFCM – Mistura de Teofilina com Clindamicina

VP – Verapamil

VC – Voltametria Cíclica

## SUMÁRIO

<b>1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1.1 – Considerações Gerais.....</b>	<b>15</b>
<b>1.2 – Técnicas Eletroquímicas .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.1 – Voltametria Cíclica (VC) .....</b>	<b>18</b>
<b>1.2.2 –Amperometria .....</b>	<b>20</b>
<b>1.3 – Análise por Injeção em Batelada (BIA).....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 – Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB) .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5 – Propriedades e métodos para a determinação da Teofilina (TF), Clindamicina (CM), Varfarina (VF) e Verapamil, (VP).....</b>	<b>25</b>
<b>1.5.1 – Teofilina (TF) .....</b>	<b>25</b>
<b>1.5.2 – Clindamicia (CM) .....</b>	<b>30</b>
<b>1.5.3 – Varfarina (VF) .....</b>	<b>31</b>
<b>1.5.4 - Verapamil (VP).....</b>	<b>33</b>
<b>2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>36</b>
<b>2.1 – Objetivo Geral .....</b>	<b>36</b>
<b>2.2 – Objetivos Específicos.....</b>	<b>36</b>
<b>3 – PROCEDIMENTO DA PESQUISA .....</b>	<b>36</b>
<b>3.1- Reagentes e soluções.....</b>	<b>36</b>
<b>3.2 – Instrumentação.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.1 – Análises Eletroquímicas .....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.2 – Sistema BIA utilizado nas análises.....</b>	<b>37</b>
<b>3.2.3 – Eletrodo de trabalho.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 - Comportamento eletroquímico da TF, CM, VF e VP .....</b>	<b>39</b>
<b>3.4 – Otimização dos parâmetros BIA-MPA. ....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.1 – Estudo do potencial de detecção da TF, CM, VF e VP. ....</b>	<b>39</b>
<b>3.4.2 – Estudo do potencial de limpeza da TF, CM, VF e VP.....</b>	<b>40</b>
<b>3.4.3 – Estudo do volume, velocidade de injeção e velocidade de agitação para TF, CM, VF e VP. ....</b>	<b>40</b>
<b>3.5 - Ensaios de repetibilidade.....</b>	<b>41</b>
<b>3.6 - Avaliação da faixa linear de trabalho e estudos da adição-recuperação em amostras farmacêuticas. ....</b>	<b>41</b>
<b>3.7 – Estudo do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ). ....</b>	<b>41</b>



3.8 - Comparação da metodologia proposta para a determinação de TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas com o método oficial. ....	42
3.9– Uso da seringa descartável em substituição a micropipeta automática.....	43
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	44
4.1 - Considerações gerais .....	44
4.2 - Capítulo 1 – Estudo MPA-BIA utilizando a micropipeta automática.....	44
4.2.1 – Comportamento eletroquímico da TF, CM, VF e VP.....	44
4.2.2 – Otimização dos pulsos de potencial e tempo de aplicação na detecção MPA	48
4.2.3 – Otimização do volume de injeção e das velocidades de injeção no sistema BIA .....	50
4.2.4 – Otimização da velocidade de agitação.....	51
4.2.5 – Otimização do potencial de limpeza. ....	51
4.2.6 – Ensaios de repetibilidade e determinação da faixa linear de trabalho.....	52
4.2.7 – Estudo da Faixa linear de trabalho e dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	53
4.2.8 - Ensaio de adição e recuperação em amostras farmacêuticas. ....	55
4.2.9 - Comparação da metodologia proposta para a determinação de TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira. ....	56
4.2.10 – Estudo da razão dos sinais entre os potenciais +1,7V e +1,5V da TF.....	57
4.2.11- Comparação do método proposto para a determinação de TF, CM, VF e VP com os métodos eletroanalíticos reportados na literatura.....	59
4.3 - CAPÍTULO – 2 Estudo da viabilidade de substituição no sistema de injeção no sistema BIA da micropipeta automática por uma seringa descartável. ....	65
4.3.1 – Determinação dos pulsos de potenciais de detecção e o tempo de aplicação de cada potencial. ....	65
4.3.2 – Determinação do volume de injeção e das velocidades de injeção e agitação. ....	66
4.3.3 – Ensaios de Repetibilidade e determinação da faixa linear de trabalho. ....	67
4.3.4 - Ensaio de adição e recuperação em amostras farmacêuticas. ....	69
4.3.5 - Comparação da metodologia proposta para a determinação de TF, CM e VF em formulações farmacêuticas com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira. ....	70
5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....	71
6 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....	73

## TRABALHOS REALIZADOS DURANTE O MESTRADO

### TRABALHOS APRESENTADOS EM EVENTOS CIENTIFICOS

1. ANDRADE, G. A. R.; GUEDES, T. J.; MOREIRA, D. A. R.; LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P. **determinação simples e rápida de teofilina utilizando análise por injeção em batelada com detecção amperométrica pulsada.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas/MG, 2014.
2. ANDRADE, G. A. R.; GUEDES, T. J.; MOREIRA, D. A. R.; LIMA, A. B.; ALECRIM, M. F.; DOS SANTOS, W. T. P. **Determinação da Clindamicina em formulações farmacêuticas por Análise em Injeção em Batelada com detecção Amperométrica pulsada usando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Uberlândia/MG, 2015.
3. MOREIRA, D. A. R.; GUEDES, T. J.; ANDRADE, G. A. R.; ALECRIM, M. F.; LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P. **Determinação de Colchicina em Urina por Amperometria de Múltiplos Pulsos em Sistema FIA usando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma Oral no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Uberlândia/MG, 2015.
4. GUEDES, T. J.; MOREIRA, D. A. R.; LIMA, A. B.; ALECRIM, M. F.; GUEDES, T. J.; ANDRADE, G. A. R.; DOS SANTOS, W. T. P. **Determinação de Prazosina em amostras farmacêuticas por Amperometria de Múltiplos Pulsos em FIA utilizando o eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Uberlândia/MG, 2015.
5. ALECRIM, M. F.; GUEDES, T. J.; LIMA, A. B.; ANDRADE, G. A. R.; MOREIRA, D. A. R.; MENDONÇA, V. A.; NEVES, C. D. C.; LACERDA, A. C.; DOS SANTOS, W. T. P. **Determinação simples e rápida de Cotinina por amperometria de Múltiplos Pulsos em FIA utilizando eletrodo de diamante dopado com boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica – SIBEE, Uberlândia/MG, 2015.
6. MOREIRA, D. A. R.; GUEDES, T. J.; ANDRADE, G. A. R.; ALECRIM, M. F.; LIMA, A. B.; DOS SANTOS, W. T. P. **Determinação de Colchicina por Amperometria Pulsada em Fluxo Usando Eletrodo de Diamante Dopado com Boro.** Resumo apresentado sob a forma de pôster no XXVIII Encontro Regional da Sociedade Brasileira de Química – Poços de Caldas/MG, 2015.

## 1 – INTRODUÇÃO

### 1.1 – Considerações Gerais

Os medicamentos são produtos especiais elaborados com a finalidade de diagnosticar, prevenir, curar doenças ou aliviar seus sintomas, ou seja, produtos farmacêuticos, tecnicamente, obtidos, ou elaborados, que contém um ou mais fármacos e outras substâncias, com desígnio, profilático; curativo; paliativo; ou para fins de diagnóstico (ANVISA, 2010). Para que os medicamentos tenham o efeito desejado, eles devem ser usados de forma correta e com orientação médica e farmacêutica, uma vez que, quando utilizados abaixo da dosagem podem não alcançar a sua função terapêutica esperada e em doses excessivas podem ser nocivos à saúde ou mesmo levar o paciente ao óbito.

Dentre os medicamentos, há fármacos que possuem substâncias de baixo índice terapêutico. O índice terapêutico é um dos métodos utilizados pela farmacologia de relacionar a dose da droga que produz um efeito satisfatório (terapêutico), com a dose que produz um efeito insatisfatório e/ou letal. Este índice é calculado pela razão da dose letal da droga para 50% da população (DL50) sobre a dose efetiva mínima para 50% da população (DE50) (GOODMAN E GILMAN, 2005). Por tanto, os fármacos considerados de baixo índice terapêutico são aqueles que apresentam estreita margem de segurança (janela terapêutica), onde a dose terapêutica é próxima da dose tóxica, ou seja, o valor da dose efetiva mediana (DE50) é bastante próximo do valor dados e letal mediana (DL50).

De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N° 67, DE 8 DE OUTUBRO DE 2007 da (ANVISA, 2007), as substâncias consideradas de baixo índice terapêutico são: ácido valpróico, aminofilina, carbamazepina, ciclosporina, clindamicina, clonidina, clozapina, colchicina, digitoxina, digoxina, disopiramida, fenitoína, lítio, minoxidil, oxcarbazepina, prazosina, primidona, procainamida, quinidina, teofilina, varfarina e verapamil (Cloridrato). Segundo a mesma RDC as substâncias supracitadas são definidas como de baixa dosagem/alta potência e alta dosagem/baixa potência. O grupo das substâncias ou fármacos de baixa dosagem/alta potência é composto por: clonidina, colchicina, digitoxina, digoxina, minoxidil, prazosina e varfarina. Os demais fármacos de alta dosagem/baixa potência (ANVISA, 2007).

Os fármacos de baixa dosagem/alta potência são aqueles que tem sua dose terapêutica por comprimido de aproximadamente 1 a 20mg, ou seja pode trazer complicações ao paciente que utilizar doses acima de desta faixa. Os de alta dosagem/ baixa potência tem a

dose terapêutica de acima de 200mg por comprimido, assim o paciente que utilizar o medicamento com a dose menor que este valor não terá eficiência no tratamento.

Os fármacos de baixo índice terapêutico tem uma margem de segurança estreita, e um erro de doseamento desses fármacos pode ocasionar a morte de pacientes. Nesse sentido, o controle de qualidade (CQ) destes medicamentos é extremamente importante e rigoroso. Na indústria farmacêutica o CQ já é bem estabelecido pela ANVISA, as quais devem realizar os testes desde a matéria prima até quantificação do teor no produto final do medicamento, conforme prescrito na Farmacopeia Brasileira outros compêndios indicados. No entanto, nas farmácias magistrais (farmácias de manipulação) o CQ ainda é bastante incipiente e as regras da ANVISA foram implantadas apenas na década passada. Mesmo assim, as farmácias de manipulação representam uma parcela significativa do mercado de medicamentos no Brasil, sendo atualmente o maior mercado mundial nesse setor. O motivo desse crescimento é a possibilidade dessas farmácias produzirem qualquer tipo de associação entre princípios ativos e a dosagem adequada de acordo com a receita medica, oferecendo assim, um tratamento terapêutico individualizado a cada paciente. Entre outras vantagens, destaca-se também o baixo custo dos medicamentos manipulados em comparação com os industrializados (FARMÁCIA E PAES, 2013).

Considerando o aumento de medicamentos manipulados no Brasil, a ANVISA publicou em 2000, a RDC nº33, onde foram estabelecidas, pela primeira vez, as boas práticas de manipulação em farmácias. Após alguns casos graves relacionados à intoxicação de pacientes através de medicamentos manipulados, a ANVISA estabeleceu critérios mais rigorosos para as práticas de manipulação no Brasil, principalmente no caso dos de baixo índice terapêutico, com a RDC 67/2007 que estipula regras a serem seguidas para as boas práticas de manipulação para esse grupo (ANVISA, 2007) nas farmácias de manipulação. Segunda essa resolução, as farmácias de manipulação devem realizar a análise de teor de um ou mais dos princípios ativos presente no produto final manipulado (medicamento). Cabe ressaltar que esta é única classe de fármacos onde é exigido o doseamento de cada medicamento manipulado.

Por sua vez, esse CQ exige a aplicação de um alto recurso financeiro na adaptação do espaço físico, na aquisição de equipamentos e na contratação de mão de obra especializada e formação continuada da mesma (BONFILIO *et al.*, 2010). Assim, as farmácias de manipulação se deparam com algumas dificuldades para manter o padrão e para cumprir com as exigências da RDC 67/2007, considerando os métodos estabelecidos nas farmacopeias.

Isso porque a maioria das farmácias de manipulação detêm recursos financeiros limitados em comparação à indústria farmacêutica para execução de tais práticas, as quais, em geral, são baseadas nas técnicas cromatográficas e espectroscópicas, que por sua vez, são técnicas que necessitam de equipamentos de alto custo para aplicação nesse setor (FELIX e ANGNES, 2010).

Os métodos oficiais propostos nas farmacopeias para o controle de qualidade dos fármacos de baixo índice terapêutico são na sua maioria os cromatográficos. Atualmente, o mais utilizado é o de cromatografia líquida de alta eficiência com detecção no ultravioleta, mais conhecida pela sigla HPLC (do inglês "*High Performance Liquid Chromatography*"). Estes métodos são robustos e seletivos, porém frente a outras ferramentas analíticas, apresentam alguns empecilhos, tais como: alto custo na obtenção e manutenção dos equipamentos, reagentes dispendiosos com grande geração de resíduos para as análises de rotina, baixa frequência analítica devido aos tediosos e recorrentes tratamentos de amostras, complexidade de operação precisando de mão-de-obra altamente capacitada.

Neste contexto, o desenvolvimento de métodos de baixo custo para as análises do CQ é de interesse da indústria farmacêutica e, principalmente, de extrema importância para as farmácias de manipulação. Além disso, a busca por métodos mais rápidos e que geram menos resíduos é uma tendência atual no desenvolvimento de novos métodos analíticos.

Neste cenário, surgem as técnicas eletroquímicas que permitem o desenvolvimento de metodologias analíticas mais sensíveis, seletivas, rápidas, simples, baixo custo (quando comparados com técnicas cromatográficas) e com menores impactos ambientais por não utilizarem solventes orgânicos. Entretanto, apresentam alguns problemas associados à baixa reprodutibilidade entre as análises. Com o intuito de facilitar as análises e tornar o método mais reprodutível, algumas estratégias vêm sendo realizadas, dentre elas, o uso da amperometria de múltiplos pulsos acoplado a diferentes sistemas de injeção e a escolha de eletrodos de trabalho mais estáveis.

Na amperometria de múltiplos pulsos, identificada pela sigla MPA (do inglês "*Multiple Pulse Amperometry*") há a possibilidade de aplicação de um ou mais pulsos de potencial, proporcionando a identificação de outros processos eletroquímicos da espécie analisada, além da utilização de um dos pulsos para realização da limpeza eletroquímica do eletrodo de trabalho, tornando assim a detecção eletroquímica mais reprodutível. A associação com sistemas de análise com injeção por batelada BIA (do inglês "*Batch Injection Analysis*"), proporciona uma melhor frequência analítica, redução na geração de resíduos e maior

sensibilidade frente a outras técnicas eletroquímicas estacionárias (DOS SANTOS *et al.*, 2011; GIMENES *et al.*, 2015; FELIX e ANGNES, 2010).

No caso do eletrodo de trabalho, o de Diamante dopado com Boro (DDB) é um dos exemplos de aplicação de eletrodos mais estáveis, uma vez que quando comparado com os demais eletrodos sólidos, apresenta vantagens como: ampla janela de potencial, melhor estabilidade, inércia química, entre outras (HUPERT *et al.*, 2003). Tais vantagens fazem com que a contaminação deste eletrodo seja menor e um aumento da reprodutibilidade é quase sempre alcançado na detecção eletroquímica.

Neste sentido, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um método eletroanalítico rápido, simples e de baixo custo por MPA acoplada ao sistema BIA usando o eletrodo de DDB. Dessa forma, a potencialidade deste método será avaliada para a determinação em formulações farmacêuticas das substâncias pertencentes ao grupo de baixo índice terapêutico, como a Teofilina (TF), Clindamicina (CL), Varfarina (VF) e Verapamil (VP), buscando uma alternativa para viabilizar aplicação do CQ nas farmácias de manipulação e melhorar o CQ nas indústrias farmacêuticas.

Toda fundamentação teórica sobre as técnicas eletroquímicas utilizadas, o sistema de fluxo, o eletrodo de trabalho DDB, as revisões bibliográficas dos fármacos Teofilina, Clindamicina, Varfarina e Verapamil e suas características e métodos de determinação, serão descritos a seguir.

## **1.2 – Técnicas Eletroquímicas**

Das muitas técnicas eletroquímicas, serão abordadas no presente trabalho a voltametria cíclica (VC) e amperometria de múltiplos pulsos (MPA).

### **1.2.1 – Voltametria Cíclica (VC)**

Os métodos de varredura de potencial são provavelmente os mais utilizados para estudar os processos de eletrodos, dentre eles destaca-se VC (GOSSER, 1993).

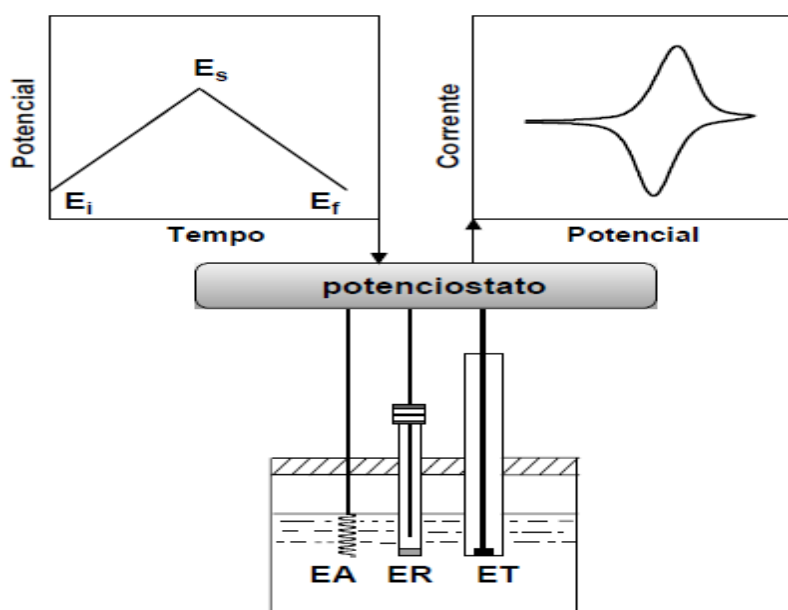
A VC é utilizada na identificação parcial da eletroatividade de determinado composto, na pesquisa de reações químicas vinculadas e em estudos sobre a superfície do eletrodo. Essa técnica também proporciona informações a respeito da reversibilidade de um sistema. Onde a reversibilidade eletroquímica está ligada a troca rápida de elétrons entre as espécies redoxes e o eletrodo (QUINTINO, 2003).

Em um experimento de VC os potenciais variam continuamente de acordo com o tempo, iniciando em um valor até atingir um valor final de potencial. Neste ponto o varrimento é invertido retornando ao ponto de partida, sendo que o potencial e a corrente resultante são registrados concomitantemente. Ao realizar um experimento envolvendo VC pode ser empregado um ciclo parcial, um ciclo inteiro ou ainda inúmeros ciclos. A curva da corrente *versos* potencial é comumente chamada de voltamograma cíclico. (SKOOG, HOLLEY e NIEMAN, 2002).

Para a realização de experimentos de VC, geralmente utiliza-se uma célula eletroquímica convencional que contém na sua composição um eletrodo de trabalho (ET), um de referência (ER) e um auxiliar (EA), mergulhados em uma solução sem agitação, onde os dados experimentais são monitorados através de um potenciostato. O eletrodo de trabalho é formado por diferentes materiais (ouro, carbono, platina, etc), é considerado o mais importante, uma vez que é nele que ocorre a reação de interesse (QUINTINO, 2003; SKOOG, HOLLEY e NIEMAN, 2002).

No voltamograma, os processos de oxidação e de redução que acontecem na superfície do ET são representados pelas correntes de pico anódica e catódica (TORMIM, 2012). A Figura 1 mostra um esquema de como acontece o processo em um experimento básico de VC.

**FIGURA 1:** Representação esquemática de um experimento de Voltametria Cíclica.  $E_i$ : potencial inicial;  $E_s$ : potencial de inversão;  $E_f$ : potencial final; ET: eletrodo de trabalho; ER: eletrodo de referência; EA: eletrodo auxiliar.



Fonte: (QUINTINO, 2003)

Diversas informações podem ser obtidas através da VC, como estudo das espécies redoxes difundidas livremente na solução e também de espécies imobilizadas na superfície do eletrodo. No entanto, a utilização desta técnica na eletroanálise é limitada quando precisa-se quantificar analitos em concentrações baixas.

### 1.2.2 –Amperometria

Na amperometria convencional, um potencial fixo é aplicado no ET em função do tempo e, durante a reação de redução ou oxidação do analito no eletrodo, a corrente é medida e relacionada com a concentração do analito (SKOOG, HOLLEY e NIEMAN, 2002; CHAILAPAKUL, SIANGPROH e TRYK, 2006). As técnicas amperométricas convencionais acopladas aos sistemas em fluxo vem se destacando frente à outras técnicas voltamétricas convencionais por apresentarem maior sensibilidade devido a diminuição da camada de difusão de Nernst. Além disso, menores efeitos de contaminação da superfície do eletrodo de trabalho podem ser observados, pois o tempo que a amostra e os produtos dos processos redox se mantem em contato direto com o ET é bastante menor em relação aos processos estacionários (DOS SANTOS *et al.*, 2011). As células eletroquímicas com três eletrodos também são usadas nas técnicas amperométricas acopladas em sistemas de fluxo. As células com configuração *wall jet* são, em geral, as mais utilizadas. Nestas células o contato do jato de solução com a superfície do eletrodo de trabalho é frontal.

Entretanto, a amperometria convencional apresenta algumas limitações como a estabilidade do sinal eletroquímico quando determinadas espécies são analisadas, como no caso de uma determinação simultânea de espécies eletroativas com diferentes potenciais redox usando somente um eletrodo de trabalho. Além disso, no que se refere à estabilidade do sinal eletroquímico, devido às reações que acontecem na interface eletrodo-solução, a superfície do eletrodo pode sofrer modificações gradativamente com o tempo, diminuindo a reprodutibilidade do método.

Neste contexto, a MPA possibilita a aplicação de vários pulsos de potencial em um único eletrodo de trabalho, o que pode contornar as limitações da amperometria convencional e também permite o monitoramento de mais de um sinal analítico pertencente aos processos eletroquímicos das espécies analisadas, ou seja, em um pulso de potencial pode ser monitorado o sinal da oxidação e no outro o sinal de redução, proporcionando a técnica, maior seletividade em amostras complexas, como as de fluidos biológicos (GIMENES *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2011).

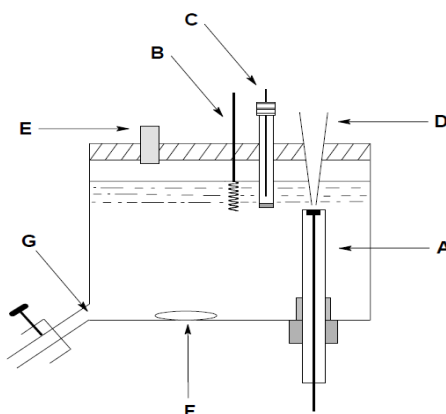


### 1.3 – Análise por Injeção em Batelada (BIA)

Na química analítica as análises em campo se tornaram essenciais em virtude do crescimento da procura por análises rápidas de inúmeras amostras, pela redução do custo e por inconvenientes relacionados ao deslocamento das amostras para os laboratórios. Todavia, se faz necessário o desenvolvimento de sistemas que apresentem elevada velocidade, menor custo nas análises, precisão e exatidão. Os métodos que se baseiam no FIA, da sigla em inglês *Flow Injection Analysis*, são comumente utilizados por proporcionar tais qualidades, além de uma boa sensibilidade e seletividade (DO SOCORRO MAIA QUINTINO, 2003; TROJANOWICZ *et al.*, 2005; FELIX e ANGNES, 2010). Outro sistema que vem sendo utilizado é o sistema BIA, o qual foi demonstrado pela primeira vez por Wang e Taha na década de 90 (WANG *et al.*, 1992), representando assim uma alternativa para a realização das análises rápidas.

No sistema BIA, pequenos volumes do composto a ser analisado são injetados, com o auxílio de uma micropipeta diretamente sobre o detector mergulhado em um volume enorme de solução (eletrólito de suporte). O composto ao entrar em contato com a superfície do detector (eletrodo de trabalho) gera um sinal transiente parecido com os gerado pelo FIA (WANG *et al.*, 1992; QUINTINO e ANGNES, 2004). Tal medição apresenta inúmeras características analógicas com o FIA, como a rapidez, pequenos volumes das amostras, repetibilidade, sensibilidade e seletividade. Ainda tendo vantagem sobre o FIA com a não utilização de válvulas, bombas e tubos de conexão (QUINTINO, 2003). O sistema pioneiro proposto por Wang e Taha (WANG *et al.*, 1992), usado na explicação dos conceitos do BIA, foi acoplado à amperometria. Na Figura 1 é apresentado esquematicamente o diagrama da célula BIA (QUINTINO, 2003).

**FIGURA 2:** Diagrama esquemático da célula BIA. (A) eletrodo de trabalho, (B) eletrodo auxiliar, (C) eletrodo de referência, (D) ponteira da micropipeta, (E) orifício para o preenchimento da célula, (F) barra de agitação, (G) dreno.



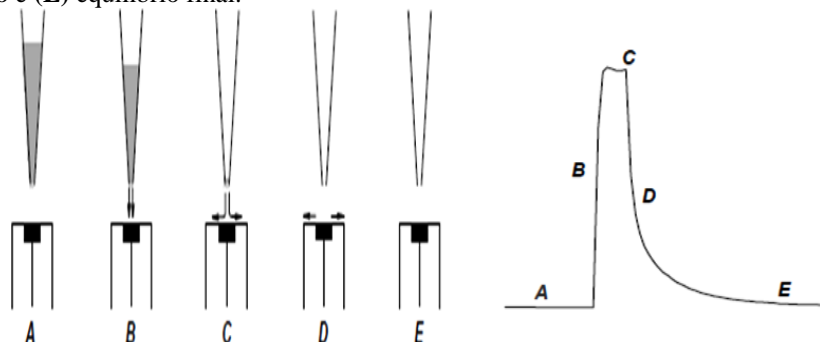
Fonte: QUINTINO, 2003

Como pode ser observado na Figura 2, a posição do eletrodo de trabalho é contrária ao injetor (micropipeta com ponteira), adquirindo uma posição inversa a das células eletroquímicas convencionais. As injeções das soluções analisadas podem ser realizadas através de uma micropipeta convencional ou eletrônica. No entanto, para melhor execução do método é preferencial a utilização da micropipeta eletrônica, devido ao ganho de precisão. Tal ganho é alcançado com a micropipeta eletrônica porque os parâmetros como volume e velocidade de injeção são ajustados eletronicamente.

O injetor fica acoplado na célula através de um orifício localizado na parte superior (tampa da célula), de modo que a extremidade onde ocorre a saída da solução do composto esteja na posição frontal fazendo com que todas as injeções sejam executadas com a mesma distância da superfície do eletrodo de trabalho. Este sistema permite a movimentação do eletrodo de trabalho, que por sua vez possibilita regular a melhor distância entre ponta do injetor até a superfície do eletrodo de trabalho. A tampa da célula possui mais dois orifícios para a fixação dos eletrodos de referência e auxiliar. Quando necessário, pode ser utilizado um mecanismo de agitação para auxiliar na dispersão da solução analisada da superfície do eletrodo para o eletrólito de suporte (solução já presente no interior da célula). E para finalizar, o volume do eletrólito suporte adicionado na célula precisa ser suficiente para que haja contato (transferência de corrente) entre os eletrodos.

A Figura 3 mostra o que ocorre quando a solução é injetada na superfície do eletrodo e o perfil de pico que será formado na detecção eletroquímica com sistema BIA. Entre A e B o composto a ser analisado (volume em microlitros) é injetado, formando uma zona que é dissipada no percurso do eletrodo de trabalho, com o transporte reprodutivo e a dissipação monitorada em tempo e espaço. Em B e C acontece a resposta analítica com formato de pico transiente. De C para D há uma queda do sinal que chega até a linha de base (D para E). A redução instantânea é decorrente do efeito “*washing out*” (efeito de limpeza) – configuração wall jet. A amplitude do sinal é proporcional à concentração do composto a ser analisado (QUINTINO, 2003).

**FIGURA 3:** Diagrama das etapas na aquisição do sinal do BIA. (A) antes da injeção, (B) transporte, (C) fim da injeção, (D) dispersão e (E) equilíbrio final.



Fonte: QUINTINO, 2003

O êxito do BIA pode estar no princípio hidrodinâmico da célula *wall jet* e a alta diluição da amostra no eletrólito de suporte dentro da célula. As primeiras células desenvolvidas que foram utilizadas no BIA apresentavam volumes elevados de eletrólito suporte (250-700 mililitros), garantindo alta dissolução das amostras injetadas com volume na ordem de microlitros. Entretanto, os experimentos do BIA com amperometria também tem sido bem sucedido em células pequenas com volumes menores, onde não é observado o efeito de memória do sinal do analito, acabando assim com a necessidade de uma grande quantidade de volume de eletrólito na célula (QUINTINO, 2003). Nesse sentido, as células de volume interno menor (100 mililitros) possibilita um fácil manuseio e adaptação para análises *in loco*, a precisão, simplicidade e alta frequência analítica (características do sistema BIA) sendo mantidas.

Como explicitado anteriormente, a micropipeta eletrônica atribui quesitos importantes para o sistema BIA, mas a utilização da mesma aumenta os custos do processo. Mediante aos valores elevados atualmente desses sistemas de injeção para uma possível aplicação em farmácias de manipulação, propõe-se neste trabalho a substituição da micropipeta eletrônica por uma seringa descartável, usada na aplicação de insulina.

O uso de seringa descartável já foi proposto por Gimenes e colaboradores, (GIMENES *et al.*, 2011), onde esses autores mostraram que é possível determinar de forma eficiente e com um custo mais baixo, pois a micropipeta automática custa em média 1.250,00 dólares já a SI custa em média 0,50 centavos de reais, ou seja, é possível obter resultados com esse sistema alternativo que sejam semelhantes aos obtidos com uma micropipeta automática para análise em formulações farmacêuticas. No entanto, uma limitação da utilização da seringa descartável é que este sistema não permite a variação exata do volume injetado e alguns cuidados devem ser tomados para se ter uma boa reprodutibilidade nas análises.

Uma alternativa para melhorar a reprodutibilidade é a utilização de ET mais robustos e o Eletrodo de Diamante dopado com Boro, entre os eletrodos sólidos além de apresentar outras vantagens como anteriormente já citado nesse trabalho.

#### 1.4 – Eletrodo de Diamante Dopado com Boro (DDB)

Dentro da química analítica, o desenvolvimento de sensores eletroquímicos tem sido um dos setores majoritários e que tem crescido rapidamente, em especial pelos novos desafios instituídos por amostras de importância industrial, clínica, forense e ambiental, levando a ampliação da procura por sensores com características peculiares, como: alta sensibilidade, seletividade e estabilidade (FREIRE, PESSOA e KUBOTA, 2003). Neste contexto, o eletrodo de diamante dopado com boro tem chamando atenção para as aplicações nas diversas áreas da eletroquímica.

Os métodos básicos mais usados para a síntese do diamante artificial são a deposição química a partir da fase de vapor (do inglês “*chemical vapor deposition*”, sigla CVD) e o crescimento em alta-pressão/alta-temperatura (do inglês “*high-pressure/high-temperature*”, sigla HPHT) (DE BARROS *et al.*, 2005; HUPERT *et al.*, 2003), onde o que se aproxima do processo natural de formação do diamante é o HPHT. Tais métodos foram desenvolvidos na década de 50. Sendo que a primeira produção de diamante artificial foi relatada, em 1952 por William Eversole, com o método CVD e em 1955 a General Electric desenvolveu o método HPHT (DE BARROS *et al.*, 2005). O método mais utilizado atualmente para a produção de filme de diamante é o CVD (PLESKOV, 2002).

O filme de diamante pode ser produzido sobre vários tipos de substratos (GONÇALVES DA SILVA *et al.*, 1999). Este filme de diamante quando dopado adquire ótima condutividade tornando um provável material para o uso como eletrodo, possibilitando a utilização de diversos elementos na dopagem como o boro, fósforo, enxofre e/ou nitrogênio. O boro é o elemento mais usado na dopagem do filme, a sua concentração deve ser de  $1 \times 10^{19}$  de átomos por  $\text{cm}^{-3}$  ou mais. Normalmente esta dopagem é executada enquanto o filme cresce, mas para tal propósito precisa ser usada uma substância de boro, como o trimetil-borato, onde este é colocado na fase gasosa em uma proporção de 10-10000 ppm. A concentração do boro no filme influencia diretamente no diamante adquirido, como  $10^4 \Omega \text{ cm}$  proporcional à concentração de boro  $10^{21}$  átomos por  $\text{cm}^{-3}$ . Portanto, propriedades do filme de diamante podem variar desde as de material dielétrico para as de semicondutor, semicondutor

degenerado e semimetal, de acordo com o aumento da concentração da dopagem (PLESKOV, 2000).

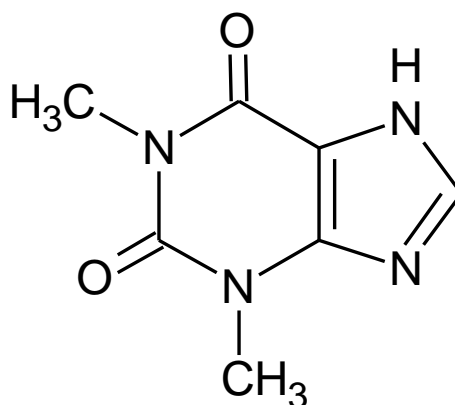
Para a aplicação na eletroanalítica e eletroquímica, quando comparados com as demais estruturas carbônicas como o grafite, carbono vítreo entre outros, o filme de diamante dopado com boro oferece propriedades muito atraentes, como por exemplo, ampla janela de potencial, rápida cinética na transferência de elétron, baixa passivação, resistência à corrosão e baixa corrente de fundo (DE BARROS *et al.*, 2005). Tais propriedades permitem ao eletrodo de diamante dopado com boro ser utilizado em análises de diferentes amostras como é comercializado (sem modificação da superfície do eletrodo). Diante disso o DDB também pode ser utilizado em amostras como fármacos.

## **1.5 – Propriedades e métodos para a determinação da Teofilina (TF), Clindamicina (CM), Varfarina (VF) e Verapamil, (VP).**

### **1.5.1 – Teofilina (TF)**

A Teofilina (1, 3-dimetilxantinaTF), um alcaloide da família da metilxantina, é comumente utilizada no tratamento de doenças ligadas ao aparelho respiratório, como asma brônquica, broncoespasmo, doença pulmonar obstrutiva crônica e enfisema pulmonar, além de ser um estimulante do sistema nervoso central e músculo cardíaco e apresentar efeito diurético (RANG, DALE e RITTER, 2001). Os seus mecanismos de ação se baseiam na inibição de fosfodiesterases (PDE) com aumento da concentração de cAMP (monofosfato cíclico de adenosina) e cGMP (monofosfato cíclico de guanosina) e antagonismo da adenosina (GOODMAN e GILMAN, 2005).

Por apresentar baixa solubilidade é algumas vezes combinada à etilenodiamina, formando o medicamento aminofilina, o qual também é utilizado no tratamento de distúrbios respiratórios. A TF pode gerar efeitos tóxicos agudos em doses únicas elevadas, tanto por via oral ou intravenosa (GOODMAN e GILMAN, 2005). Na Figura 4 encontra-se a fórmula estrutural da TF e na Tabela 1 é apresentada suas propriedades físico-químicas.

**FIGURA 4:** Fórmula estrutural da Teofilina.**TABELA 1:** Propriedades Físico-Químicas da TF

<b>Formula molecular</b>	C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub>
<b>Massa molar:</b>	180.17 g mol <sup>-1</sup>
<b>Aparência:</b>	Pó cristalino, branco, sem odor e com sabor amargo.
<b>Estado físico:</b>	Sólido cristalino.
<b>Ponto de fusão:</b>	270-274°C
<b>Solubilidade:</b>	Ligeiramente solúvel em álcool, mais solúvel em água quente; solúvel em soluções alcalinas
<b>pKa</b>	8.8

Fonte: [www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/theophylline180165855911?lang=pt&region=BR](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/theophylline180165855911?lang=pt&region=BR)

Os métodos oficiais preconizados pela Farmacopeia Brasileira para doseamento da TF são baseados por espectrofotometria e cromatografia, cuja execução é mais tediosa e complexa devido ao tratamento da amostra, principalmente para análise cromatográfica. O método baseado na espectrofotometria de absorção no ultravioleta, embora apresente um custo e complexidade menor, necessita de uma etapa de filtragem da amostra antes da análise e não é muito seletivo.

Na literatura são encontrados diversos métodos para a determinação da TF, como a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Kanakal *et al.*, 2014), (Martinc *et al.*, 2014), cromatografia gasosa (GC) (Suresh *et al.*, 2011), cromatografia de camada delgada (CCD) (Tzanavaras, Zacharis e Themelis, 2010), espectrofotometria (Xia, Ni e Kokot, 2013). Apesar de todos esses métodos serem robustos e seletivos, muitos deles apresentam etapas tediosas no preparo das amostras, exigindo pré-tratamentos com solventes orgânicos, gerando

quantidades significativas de resíduos nas análises, além da complexidade de operação e o custo elevado de alguns desses equipamentos.

Neste contexto, os métodos eletroquímicos apresentam-se como uma alternativa bastante atrativa, principalmente por considerar a eletroatividade da TF aliada à sua simplicidade de execução, baixo custo e rapidez. Com esta perspectiva já estão descritos vários métodos para a determinação da TF na literatura, os quais são mostrados na Tabela 2.

**TABELA 2:** Métodos eletroquímicos para determinação da TF.

<b>Eletrodo*</b>	<b>Técnica**</b>	<b>Tipo de Amostra***</b>	<b>Referência</b>
P.C	V.P.D	Plasma	(MUNSON e ABDINE, 1978)
E. NMP. TNQ	Amperometria	Form.farm	(MCNEIL, COOPER e SPOORS, 1992)
Hg. G	V.P.D	Form. farm	(SHUBIETAH, ABUZUHRI e FOGG, 1994)
P.C.M.Co	V.P.D	Form.farm	(YANG <i>et al.</i> , 2004)
N.T.C. Pt.N	V.C	Form.farm	(LIU <i>et al.</i> , 2008)
P.C. C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> BrN	V.C/V.P.D	Form.farm/Urina	(HEGDE, HOSAMANI e NANDIBEWOOR, 2009)
C.V.A.Cis	V.C/V.P.D	Form. farm	(BRUNETTI e DESIMONI, 2009)
N.T.C	V.C	Form. farm	(SUN e HU, 2013)
N.T.C.Naf.C.V	V.C/V.P.D	Form. farm	(YANG <i>et al.</i> , 2010)
C.V. G/Naf	V. P. D	Form. farm	(LI <i>et al.</i> , 2012)
C.V. G	V. C	Chá	(CUI E ZHANG, 2013)
DDB	V.P.D/V.O.Q	Form.farm/Urina	(CINKOVA <i>et al.</i> , 2015)
M.PPT	Potenciometria	Form. farm	(RIAHY <i>et al.</i> , 2005)
N.T.C. MnO <sub>2</sub>	V.C/V.P.D	Form. Farm	(YANG e Li, 2015)
Naf/RuO <sub>2</sub>	V.O.Q	Form. Farm/Chá	(ZEN, YU e SHIH, 1999)
C.V.AHNSA	V.P.D	Form. Farm	(AMARE e ADMASSIE, 2012)
C.V.CdSe	V.C/V.P.D	Chá	(YIN <i>et al.</i> , 2012)
Au.L-Cy.Naf.G	V.P.D	Form. Farm	(ZI <i>et al.</i> , 2012)
C.GMP. Naf	V.C/V.P.D	Soro sanguíneo	(GAO, WANG e GUO, 2013)



G.AuAIQ	V.P.D/V.C	Form.farm/Urina	(YANG, ZHAO e ZENG, 2014)
C.V.AT-Au	V.P.D/V.C	Soro sanguíneo/Urina	(KESAVAN e JOHN, 2014)
Np.C SG	V.P.D/V.C	Form.farm	(GUNEY e CEBECI, 2015)
DDB	V.P.D/V.C	Form.farm	(SPATARU <i>et al.</i> , 2002)

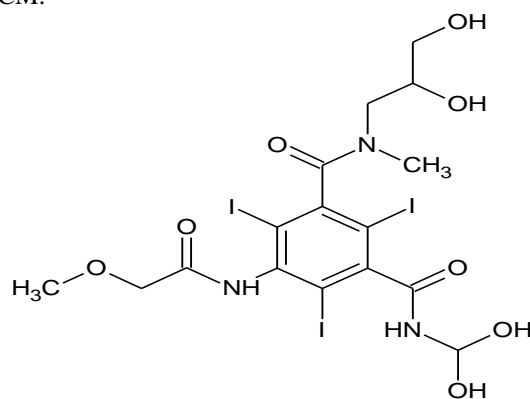
\*P.C-pasta de carbono, E.NMP. TCNQ-enzimaticofenazinametossulfato, tetracianoquinodimetano, Hg. G- mercúrio gotejante, P.C.Co- pasta de carbono modificado com Cobalto, N.T.C. Pt.N- nanotubo de carbono com nanopartículas de Platina, P.C. C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>BrN-pasta de carbono modificado com brometo de cetiltrimetilamônio, C.V.A.Cis-carbono vítreo modificado com ácido cisteico, N.T.C-nanotubo de carbono, N.T.C.Naf.C.V – nanotubos de carbono com paredes de nafion modificado com carbono vítreo, C.V. G/Naf- carbono vítreo modificado com grafeno/nafion , C.V.G- carbono vítreo modificado com grafeno, M.PPT- membrana de 2,6-bis (fenil) -4 (fenil) 3H-tiopiran, N.T.C. MnO<sub>2</sub>- nanotubo de carbono com nanopartículas de MnO<sub>2</sub>,Naf/RuO<sub>2</sub>- nafion modificado com RuO<sub>2</sub>, C.V.AHNSA- carbono vítreo modificado com 4-amino-3-hidroxinaftaleno ácido sulfônico, Au.L-Cy.Naf.G-ouro modificado com L-cisteína/nafion/grafeno, C.GMP. Naf-carbono mesoporoso modificado com nafion, G.AuAIQ-grafeno modificado com nanopartículas de ouro com anisotrópica -quitosana iônica, C.V.AT-Au-carbono vítreo modificado com nanopartículas de Au, Np.C SG-nanopartículas de carbono modificado com filme de sol-gel.\*\*V.P.D- voltametria de pulso diferencial, S.W.V- voltametria de onda quadrada, \*\*\*Form. Farm- formulações farmacêuticas,

Na maioria dos trabalhos descritos na Tabela 2 foram utilizados eletrodos modificados por meio de técnicas voltamétricas. Tais modificações deixam a metodologia mais complexa, acarretando mais tempo para execução do procedimento. Logo, eletrodos que possuam boas características eletroquímicas sem necessidade de modificação, são mais indicados para análises de rotina, visto que aumentariam a praticidade da metodologia analítica. Um exemplo deste eletrodo seria o DDB, o qual já foi também aplicado como mostrado na Tabela 2, porém este ainda não foi associado à detecção amperométrica pulsada em sistema BIA para determinação da TF, podendo a proposta deste trabalho melhorar os parâmetros analíticos e a simplicidade para aplicação do método.

### 1.5.2 – Clindamicia (CM)

A Clindamicina (CM) é um composto proveniente da Lincomicina, atuando como um antibiótico que age na supressão da síntese proteica bacteriana. A CM é comumente utilizada no tratamento de infecções superficiais da pele e em pacientes com malária e AIDS (Goodman e Gilman, 2005), (Raju *et al.*, 2008). A fórmula estrutural da CM é apresentada na Figura 5 e as suas propriedades físico-químicas na Tabela 3.

**FIGURA 5:** Fórmula estrutural da CM.



**TABELA 3:** Propriedades Físico-Químicas da CM.

<b>Formula molecular</b>	C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> ClN <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S
<b>Massa molar:</b>	428.09g mol <sup>-1</sup>
<b>Aparência:</b>	Amarelo, branco
<b>Estado físico:</b>	Sólido amorfo.
<b>Ponto de fusão:</b>	141-143°C
<b>Solubilidade:</b>	Boa solubilidade em água; levemente solúvel em álcool
<b>pKa</b>	7.79

**Fonte:** [www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/clindamycinhydrochloride461442146239511?lang=pt&region=BR](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/clindamycinhydrochloride461442146239511?lang=pt&region=BR)

O método oficial para a determinação da CM em formulações farmacêuticas é preconizado pela Farmacopeia Brasileira e baseado na cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC com detecção UV). Outros métodos para a determinação da CM encontrados na literatura são na sua grande maioria baseados nos métodos cromatográficos, tanto em formulações farmacêuticas, quanto em fluidos biológicos, como por HPLC com diferentes detectores (LANDIS, GRANT e NELSON, 1980; HORNEDONUNEZ *et al.*, 1990; LIU *et al.*, 1997; FIEGER-BUSCHGES *et al.*, 1999; YU *et al.*, 1999; BATZIAS, DELIS e KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU, 2004; CHO *et al.*, 2005; PLATZER e WHITE, 2006) e espectroscópicos, onde são utilizados sem técnicas de separação (TEHRANI *et al.*, 2013; ELYAZBI e BLAIH, 1993).

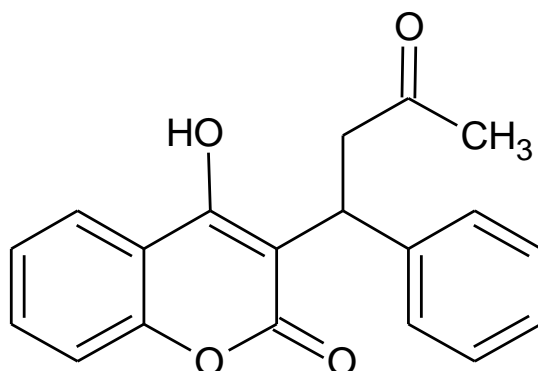
Os métodos eletroquímicos podem também ser utilizados para a determinação da CM por apresentarem vantagens anteriormente explicitadas, no entanto, há poucos trabalhos descritos na literatura. Dentre estes, o de Norouzi e colaboradores em 2008 (NOROUZI *et al.*, 2008) no qual os autores utilizaram um microeletrodo de ouro (Au) com a técnica de VC acoplada a um sistema em fluxo nas análises de formulações farmacêuticas. Neste trabalho, o tratamento dos dados foram feitos pela técnica matemática de transformada de Fourier. Zhang e colaboradores em 2010 (ZHANG *et al.*, 2010) usaram um eletrodo de nanopartículas de Au modificado por um filme fino de sol-gel de polímeros molecularmente impressos, utilizando a técnica eletroquímica VPD em amostras de fluido biológico (urina humana). Habib e colaboradores em 2011 (HABIB, RIZK e EL-ARYAN, 2011) com o eletrodo de pasta de carbono por VPD e voltametria de onda quadrada determinaram a CM em amostras de formulações farmacêuticas e urina. Nota-se que na maioria dos trabalhos supracitados utilizaram técnicas estacionárias e eletrodo modificado para determinação da CM, não sendo ainda relatado o uso do eletrodo de DDB que está sendo proposto neste trabalho.

### **1.5.3 – Varfarina (VF)**

A Varfarina (VF), 4-hidroxi-3-(3-oxi-1-fenil-butil)-cumarina, é um fármaco anticoagulante vastamente prescrito para impedir a progressão ou reincidência da trombose profunda aguda ou da embolia pulmonar após um curso inicial de heparina, podendo também ser utilizada como terapia na prevenção do tromboembolismo venoso, do embolismo sistêmico em pacientes com prótese de válvulas cardíacas, de acidente vascular cerebral e do infarto agudo do miocárdio. É um antagonista da vitamina K e, portanto administrada em doses terapêuticas diminui em 30 a 50% a quantidade total dos fatores de coagulação

dependentes desta vitamina, inibindo a síntese de protrombina e diminuindo a capacidade do sangue em formar coágulos (GOODMAN e GILMAN, 2005). A fórmula estrutural da VF encontra-se na Figura 6 e suas principais propriedades físico-químicas na Tabela 4.

**FIGURA 6:** Fórmula Estrutural da VF



**TABELA 4:** Propriedades Físico-Químicas da VF.

<b>Formula molecular</b>	C <sub>19</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>
<b>Massa molar:</b>	308.33g mol <sup>-1</sup>
<b>Aparência:</b>	Pó branco, Inodoro, Insípido
<b>Estado físico:</b>	Sólido cristalino.
<b>Ponto de fusão:</b>	161 °C
<b>Solubilidade:</b>	Solúvel em acetona, dioxano, solução aquosa alcalina, moderada em metanol, etanol, isopropanol, alguns óleos e praticamente insolúvel em benzeno, ciclo-hexano
<b>pKa</b>	5.08

**Fonte:** [www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/warfarin308338181211?lang=pt&region=BR](http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/warfarin308338181211?lang=pt&region=BR)

A VF é uma substância pertencente ao grupo de baixo índice terapêutico, deste modo é de suma importância o seu controle de qualidade. Os métodos preconizados para a determinação da VF pela Farmacopeia Brasileira são baseados na espectrofotometria de absorção no ultravioleta e a cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (HPLC-UV).

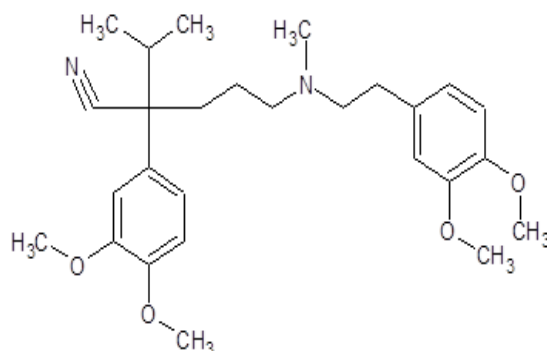
Inúmeros métodos são descritos na literatura para a determinação da VF como a HPLC com detecção ultravioleta (MIURA *et al.*, 2011; GHAMBARI e HADJMOHAMMADI, 2012), HPLC acoplada a espectrometria de massas (ZUO *et al.*, 2010; HOU, ZHENG e SHAMSI, 2007), espectrofotometria (DE ARMAS *et al.*, 2002), potenciometria (HASSAN, MAHMOUD e ABDEL-SAMAD, 1998; HASSAN *et al.*, 2005), espectroscopia Raman (ARRUABARRENA, COELLO e MASPOCH, 2014) fluorimetria

(SMIRNOVA *et al.*, 2009), reflectância no infravermelho (NIR) (ARRUABARRENA, COELLO e MASPOCH, 2013). Os métodos anteriormente citados na grande maioria apresentam inconvenientes como uma baixa frequência analítica, alto custo das análises e elevada geração de resíduos, como por exemplo, os que usam as técnicas cromatográficas.

Os métodos eletroquímicos também podem ser utilizados para a determinação da VF, porém existem poucos trabalhos relatados na literatura. Belal e Anderson em 1985 (BELAL e ANDERSON, 1985) utilizaram um eletrodo de trabalho de carbono vítreo em um sistema de injeção em fluxo acoplado ao detector amperométrico para amostras de formulações farmacêuticas. Ghoneim e Tawfik em 2004 (GHONEIM e TAWFIK, 2004) usaram o eletrodo de gota pendente de mercúrio e a voltametria de onda quadrada com redissolução catódica nas amostras de formulações farmacêuticas, sangue e urina humana. Gholivand e colaboradores em 2015 (GHOLIVAND, TORKASHVAND e YAVARI, 2015) para a determinação da VF em amostras de formulações farmacêuticas, sangue e urina humana, usaram a técnica de VOQ com redissolução anódica com um eletrodo de trabalho de pasta de carbono modificado com nanopartículas de ferro. Portanto, até o momento, nenhum trabalho foi encontrado com o eletrodo de DDB, bem como com o sistema BIA com detecção MPA que será proposto neste trabalho.

#### **1.5.4- Verapamil (VP)**

O Verapamil (5- [N- (3,4-dimetoxifenil) -N-metilamino] - 2- (3,4-dimetoxifenil) - 2-isopropil valeronitrilo - VP), é derivado sintético da papaverina, que pertence à classe de fenilalquilamina. O VP é um bloqueador do canal de cálcio que atua relaxando os músculos do coração e vasos sanguíneos e é usado no tratamento de hipertensão (pressão arterial elevada), angina (dor no peito), e certos distúrbios do ritmo cardíaco (GOODMAN E GILMAN, 2005). A fórmula estrutural do VP é apresentada na Figura 7 e suas principais propriedades físico-químicas na Tabela 5.

**FIGURA 7:** Fórmula Estrutural do VP**TABELA 5:** Propriedades Físico-Químicas do VP.

<b>Formula molecular</b>	C <sub>27</sub> H <sub>38</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
<b>.Massa molar:</b>	454.1g mol <sup>-1</sup>
<b>Aparência:</b>	Pó branco, Inodoro, Insípido
<b>Estado físico:</b>	Sólido cristalino.
<b>Ponto de fusão:</b>	141-144 °C
<b>Solubilidade:</b>	Solúvel em água, pouco solúvel em etanol, muito solúvel em clorofórmio, praticamente insolúvel em éter
<b>pKa</b>	9.68

**Fonte:** [www.acofarma.com/admin/uploads/download/2952b9e8cb222db4d6ea09da06361191866e7856661f/main/files/Verapamil%20cloridrato\\_pt.pdf](http://www.acofarma.com/admin/uploads/download/2952b9e8cb222db4d6ea09da06361191866e7856661f/main/files/Verapamil%20cloridrato_pt.pdf)

O método preconizado pela Farmacopeia Brasileira é a espectrofotometria de absorção no ultravioleta e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV). Para a determinação do VP os métodos descritos na literatura são baseados nas técnicas cromatográficas (CECCATO *et al.*, 1996; GARCIA *et al.*, 1997; IVANOVA *et al.*, 2008; SULTANA, ARAYNE e WAHEED, 2011; ASAFU-ADJAYE e SHIU, 1998; HUBERT *et al.*, 1992; BORGES *et al.*, 2005), espectrofotométricas (HAMIDI e JOUYBAN, 2015; RAHMAN e AZMI, 2004; KHALIL e KELZIEH, 2002), potenciométricas (FARIDBOD *et al.*, 2009; BO e LU, 1990), eletroquimioluminescência (LI *et al.*, 2011), eletroforese (DETHY *et al.*, 1994). Tais métodos apresentam boa robustez e estabilidade, no entanto tem alguns empecilhos para as análises de rotina devido as etapas de preparo das amostras, o alto custo dos equipamentos, a necessidade de mão de obra qualificada, entre outros.

Neste cenário, os métodos eletroquímicos surgem como uma possibilidade apresentando vantagens como baixo custo, geração de menos resíduos e tratamento menos

tedioso das amostras, entre outras. A Tabela 6 mostra os métodos eletroquímicos descritos na literatura para a determinação do VP e em nenhum deles o eletrodo de DDB foi utilizado e nem o sistema BIA com detecção MPA que está sendo proposto neste trabalho.

**TABELA 6:** Métodos eletroquímicos para a determinação do VP.

<b>Eletrodo*</b>	<b>Técnica**</b>	<b>Tipo de Amostra</b>	<b>Referência</b>
C.V.N.T.C	V.P.D/V.C	Form. Farm/Sangue	(CHAMJANGALI <i>et al.</i> , 2015)
C.V.N.T.C/P.CA	V.O.Q.R.A/ V.P.D.R.A	Form. farm	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013)
P.CFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> MCM-41	V.P.D/V.C/ V.O.Q	Sangue	(HASANZADEH <i>et al.</i> , 2013)
M.C.N.Au	V.C	Sangue	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
G.PHg	V.O.Q.R.C	Form. Farm/Urina	(KASIM <i>et al.</i> , 2002)

\*C.V.N.T.C/P.CA-eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono e polímero de cloridrato de alilamina, P.CFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>MCM-41-eletrodo de pasta de carbono com substância magnética e matéria cristalina móvel – 41, M.C.N.Au-eletrodo de microchip com um conjunto de nanoeletrodos de Au, G.PHg-eletrodo de gota pendente de Hg, \*\*V.O.Q.R.A-voltametria de onda quadrada com redissoluçãoanódica, V.O.Q.R.C-voltametria de onda quadrada com redissolução catódica, V.P.D.R.A-voltametria de pulso diferencial com redissoluçãoanódica.

Por fim, pode-se observar que os trabalhos existentes na literatura que baseados em técnicas eletroanalíticas desenvolvidos para determinação da TF, CM, VF e VP não exploraram toda a capacidade da detecção eletroquímica. Isto porque vários pontos ainda podem ser aperfeiçoados nos mesmos, principalmente, em relação à simplicidade e frequência analítica desses métodos usando o sistema BIA como ferramenta analítica. Além disso, vários destes trabalhos apresentam possibilidade de melhorar a reprodutibilidade das análises através da utilização de eletrodos mais estáveis, como o DDB, e as técnicas eletroquímicas que permitam a maior limpeza da superfície dos sensores, como a MPA, elevando à robustez da metodologia e consequentemente a confiabilidade do método. Assim, considerando a potencialidade da detecção MPA acoplada ao sistema BIA usando o eletrodo de DDB, o presente trabalho apresenta a possibilidade do uso de um método alternativo para análise de VP, CM, TF e VF em formulações farmacêuticas.

## **2 – OBJETIVOS**

### **2.1 – Objetivo Geral**

- Desenvolver um método analítico, rápido, simples e de baixo custo por meio da detecção MPA em sistema BIA com eletrodo de DDB, visando o controle de qualidade dos fármacos de baixo índice terapêutico em formulações farmacêuticas, usando como modelo quatro compostos desta classe, o VP, CM, TF e VF.

### **2.2 – Objetivos Específicos**

- Otimizar os parâmetros da detecção MPA para determinação de cada fármaco de baixo índice terapêutico estudado.
- Otimizar os parâmetros do sistema BIA para determinação de cada fármaco de baixo índice terapêutico estudado.
- Otimizar os parâmetros analíticos do método BIA-MPA para determinação de cada fármaco de baixo índice terapêutico estudado.
- Otimizar os parâmetros de validação das técnicas desenvolvidas por BIA-MPA para aplicação nas indústrias e farmácias de manipulação.
- Avaliar a substituição da micropipeta automática pela seringa de insulina, almejando a redução de custos no sistema BIA com detecção MPA
- Otimizar os parâmetros de validação das técnicas desenvolvidas por BIA-MPA usando a seringa para aplicação nas indústrias e farmácias de manipulação.

## **3 – PROCEDIMENTO DA PESQUISA**

### **3.1- Reagentes e soluções**

As soluções foram preparadas com água deionizada ultra purificada obtida em sistema Mili-Q (Millipore) e os reagentes utilizados foram de grau analítico (Sigma-Aldrich). Como eletrólitos de suporte para investigação da detecção eletroquímica utilizou-se o ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) (grau de pureza 95,0%), tampão fosfato (pH 7,0) (grau de pureza 99,0%), tampão fosfato (pH 7,0) (grau de pureza 99,0%) com álcool etílico (grau de pureza 99,8%).



As soluções estoque dos padrões da TF, CM, VF e VP obtidos da Sigma-Aldrich (grau de pureza de 99,0%) foram preparadas em meio aquoso na concentração de  $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e colocadas em banho de ultra-som (Unique: USC-1400). Partindo das soluções estoque fez-se a diluição para a concentração  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  com o eletrólito de suporte de cada fármaco na realização das análises. Para a preparação das soluções com os comprimidos foi adotada a mesma metodologia. Os comprimidos dos fármacos foram adquiridos em drogarias na cidade de Diamantina, Estado de Minas Gerais, Brasil. Os estudos dos comportamentos eletroquímicos dos fármacos foram obtidos por voltametria cíclica com a concentração de  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  em eletrólito de suporte.

Durante a execução do método proposto realizou-se outras diluições da solução estoque dos padrões para investigação dos demais parâmetros analíticos. Os estudos de otimização da técnica para determinação dos fármacos por meio da detecção MPA-BIA, foram realizados utilizando como eletrólitos de suporte o ácido sulfúrico  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  para a TF, o tampão fosfato (pH 7,0) para a CM, tampão fosfato (pH 7,0) com 10 % de álcool etílico para a VF e o ácido sulfúrico  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  para o VP.

Na realização dos ensaios de tratamento da superfície do eletrodo de DDB foi utilizada uma solução de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,5 \text{ mol L}^{-1}$  e foi feita uma única vez no início de todas as análises.

## **3.2 – Instrumentação**

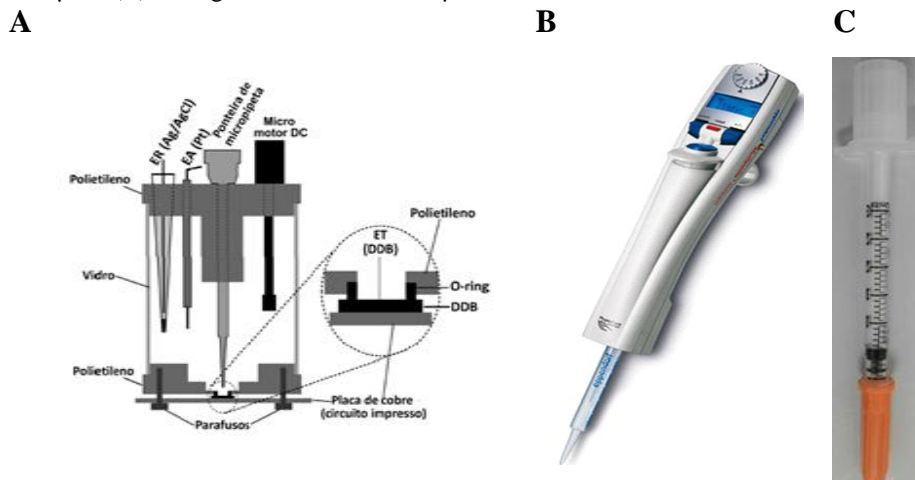
### **3.2.1 – Análises Eletroquímicas**

Todas as análises eletroquímicas foram realizadas utilizando um Potenciostato/Galvanostato da Autolab modelo PGSTAT 128N (Eco Chemie) e o gerenciamento dos dados realizado através do software General Purpose Electrochemical System (GPES) versão 4.9.

### **3.2.2 – Sistema BIA utilizado nas análises**

O sistema BIA utilizado nas análises é composto por uma célula tipo walljet, uma micropipeta automática, da Eppendorf Multipette, com ponteira tipo seringa e um motor (agitador). Com o intuito de diminuir o custo do método proposto substituiu-se a micropipeta eletrônica automática por uma seringa descartável com o volume fixo  $300 \mu\text{L}$  para realização dos estudos dos fármacos TF, CM e VF. A seringa da marca Becton Dickinson and Company, foi adquirida nas drogarias da cidade de Diamantina, Estado de Minas Gerais, Brasil. A Figura 8 mostra todas as partes do sistema.

**FIGURA 8:** Sistema BIA - (A) Célula eletroquímica com 3 eletrodos (referência, auxiliar e de trabalho) e o motor de agitação para análise por injeção em batelada (BIA); e em detalhe o eletrodo de DDB com a área delimitada por uma borracha de *o-ring*, (B) Micropipeta Automática Eppendorf Multipette com a ponteira de 1000  $\mu\text{L}$  e (C) Seringa descartável de 300 $\mu\text{L}$ .



Fonte: (TORMIN, 2011)

A célula do sistema BIA é constituída por um compartimento feito de polietileno cujo volume interno é de aproximadamente 100 mL, com uma tampa contendo quatro orifícios aonde são acoplados: a ponteira da micropipeta (orifício do centro da tampa), os eletrodos auxiliar (fio de platina) e referencia (Ag/AgCl com  $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) (orifícios a direita e a esquerda da tampa) e o motor de agitação (ofício na extremidade da tampa). Na parte inferior (base da célula) há um orifício situado no centro da célula (de frente a ponta da ponteira da micropipeta) com um O-ring (limita a área do eletrodo) onde o eletrodo de trabalho (DDB) é pressionado por uma placa metálica fixada com dois parafusos com porcas e esta também tem a função de realizar o contato elétrico deste eletrodo com o sistema. Para a realização das análises, a ponteira da micropipeta (diâmetro externo 6,0 mm) deve ser colocada no orifício central (diâmetro 6,1) de modo que fique centralizada sem movimentação para os lados.

### 3.2.3 – Eletrodo de trabalho

O eletrodo de trabalho utilizado no desenvolvimento dessa pesquisa foi o Diamante Dopado com Boro (DDB) com 8.000 ppm (área geométrica de  $0,13 \text{ cm}^2$ ), adquirido do Centro Suíço de Eletrônica e Microtecnologia SA (CSEM). O DDB antes das análises foi previamente limpo em etanol e tratado eletroquimicamente em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4 0,5 \text{ mol L}^{-1}$ . A influência dos tratamentos eletroquímicos foi avaliada no perfil das respostas voltamétricas dos analitos de interesse. O tratamento anódico foi realizado aplicando primeiramente -30mA por 360s e depois +30mA por 60s e o catódico de forma contrária. Como eletrodos de

referência e auxiliar foram utilizados o Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ), e um fio de Pt, respectivamente.

### **3.3 - Comportamento eletroquímico da TF, CM, VF e VP**

Alguns estudos do comportamento eletroquímico da TF, CM, VF e VP foram realizados através da Voltametria Cíclica (VC) com velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$  na faixa de potencial fornecida pelo DDB ( $-1,5 \text{ V}$  a  $+2,0 \text{ V}$ ) nos eletrólitos de suportes já citados referente a cada fármaco. Foi explorado também o resultado do tratamento da superfície do eletrodo de trabalho sobre o perfil dos processos eletroquímicos apresentados pelos fármacos. Para a obtenção desses resultados, realizou-se a VC para cada fármaco em três condições diferentes: sem tratamento e após tratamento anódico e catódico.

### **3.4 – Otimização dos parâmetros BIA-MPA.**

A associação da BIA-MPA foi utilizada para realizar a detecção eletroquímica dos fármacos e para isso vários parâmetros foram estudados e otimizados. Na MPA foram avaliados os potenciais a serem adotados para a detecção dos fármacos e para a limpeza eletroquímica da superfície do eletrodo de trabalho, bem como o tempo de aplicação desses potenciais. Em relação ao sistema BIA os parâmetros investigados foram a influência do volume e velocidade de injeção e a velocidade de agitação, com o intuito de atribuir melhor sensibilidade e frequência analítica para o método proposto.

#### **3.4.1 – Estudo do potencial de detecção da TF, CM, VF e VP.**

Para a definição do potencial de detecção dos fármacos TF, CM foram aplicados 12 e 13 pulsos de potenciais de  $+0,7\text{V}$  à  $+1,8\text{V}$  e de  $+0,6\text{V}$  à  $+1,8\text{V}$ , respectivamente. Com a VF também foram aplicados 8 pulsos, porém de  $+0,7\text{V}$  à  $1,4\text{V}$  devido o fato da utilização de etanol no eletrólito de suporte ser um possível interferente em potenciais acima de  $+1,4\text{V}$ . Para VP os pulsos de potenciais de oxidação foram aplicados de  $+1,0\text{V}$  a  $+1,8\text{V}$  e, como este apresentou processo de redução, os pulsos de potenciais de redução foram também avaliados de  $+0,6\text{V}$  à  $-0,2\text{V}$ . Na realização dos estudos de todos os fármacos foi utilizada uma solução padrão com concentração de  $1 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e o tempo de aplicação dos potenciais foram avaliados de 30ms a 500ms.

### 3.4.2 – Estudo do potencial de limpeza da TF, CM, VF e VP.

Para uma melhor eficiência do método foram estudados os pulsos de potenciais para a limpeza eletroquímica da superfície do DDB. Os estudos foram conduzidos da seguinte maneira: para todos os fármacos foram feitas 10 injeções sequenciais sem a aplicação do pulso e com a aplicação dos pulsos. Os pulsos de potenciais de limpeza aplicados para o estudo da TF foram +1,6V, +1,7V e +1,8V maiores que o de detecção (+1,5V) sendo levada a ideia que em potenciais maiores todas as espécies seriam oxidadas na superfície do DDB tornando-a limpa eletroquimicamente.

Para a CM foi adotado a mesma ideia, no entanto em potenciais maiores que o de detecção não foi possível a obtenção de resultados aproximasse do satisfatório e assim foi adotada outra estratégia, aplicar potenciais menores que foram +0,3V, +0,4V e +0,5V.

No estudo da VF foi observado o mesmo acontecimentos que ocorreu com a CM e neste caso foram aplicados os potenciais -0,1V, -0,2V e -0,3V.

Para o VP foram -0,3V, -0,4V, +1,0V e +1,1V por apresentar um processo de redução e logo após um de oxidação jogou-se ser os potenciais mais adequados.

No estudo do tempo de aplicação para todos os fármacos foi estudada a faixa de 30ms a 500ms.

### 3.4.3 – Estudo do volume, velocidade de injeção e velocidade de agitação para TF, CM, VF e VP.

O parâmetro usado para a escolha da velocidade de agitação foi o tempo de retorno do sinal eletroquímico (pico) para a linha de base, sendo selecionada a velocidade que apresentasse menor tempo. O motor foi eletricamente conectado a uma fonte universal AC / DC da marca Intelbras

O volume de injeção foi investigado em função do aumento de sinal numa faixa de 10- 300 $\mu$ L e levando em conta a limitação do volume da micropipeta de 1000  $\mu$ L para uma análise em triplicata.

A velocidade de injeção foi averiguada do nível 1 ao 10 (todos os níveis existentes neste modelo de micropipeta), os quais correspondem as velocidades de 15 à 143  $\mu$ L s<sup>-1</sup> da micropipeta, relacionando a escolha ao aumento de sinal.

### 3.5 - Ensaios de repetibilidade

A repetibilidade foi investigada utilizando o estudo do potencial de limpeza avaliado através do desvio padrão relativo (DPR) para 10 medidas sequenciais.

### 3.6 - Avaliação da faixa linear de trabalho e estudos da adição-recuperação em amostras farmacêuticas.

Depois da otimização de todos os parâmetros da detecção BIA-MPA, estudos foram executados para obtenção da faixa linear de trabalho para cada fármaco. A faixa linear de trabalho foi determinada com base na curva de regressão linear obtida a partir da média dos resultados apresentados pelas injeções em triplicata com as soluções padrão do analito, onde foram investigadas as concentrações de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> para todos os fármacos.

Os estudos de adição-recuperação também foram realizados. Nos mesmos, os padrões dos fármacos estudados foram adicionados nas amostras farmacêuticas previamente avaliadas pela detecção BIA-MPA. Para este estudo preparou-se uma curva de calibração de 5 pontos (mínimo exigido pela ANVISA, RDC 899/2003) com injeções em triplicata, após as injeções do último ponto da curva injetou-se a amostra e em seguida a solução mistura (amostra mais padrão). Através da equação da reta (regressão linear) foi possível encontrar os valores reais de concentração da amostra e da solução mistura. A equação 1 demonstra como foi feito o cálculo da porcentagem de recuperação (R%) para os fármacos TF, CM e VP:

$$R\% = \frac{[Am+P] - [Am]}{[TP]} \times 100 \quad \text{equação 1}$$

Onde [Am+P] é a concentração da solução mistura de amostra mais padrão, [Am] é a concentração da amostra e [TP] a concentração teórica do padrão que foi adicionada na solução mistura.

O cálculo da R% da VF teve sua execução de forma diferente usando a altura dos sinais analíticos da amostra e da solução mistura como descrito pela equação 2:

$$R\% = \frac{(SAm+P) - (SAm)}{[TP]} \times 100 \quad \text{equação 2}$$

Onde (SAm+P) é o sinal da solução mistura, (SAm) o sinal da amostra e [TP] a concentração teórica do padrão adicionada na solução mistura.

### 3.7 – Estudo do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ).

Em todos os casos estudados o LD foi calculado com a equação 3:

$$LD = \frac{3.DP}{B}, \quad \text{equação 3}$$

onde DP é o desvio padrão das medidas de 10 pontos coletados aleatoriamente no amperograma da faixa linear em locais que não apresentavam sinais analíticos (ruído do branco) e B é o coeficiente angular da equação da reta de regressão linear. A equação 4 para o LQ é semelhante, a única mudança é o fator de multiplicação que neste caso é 10:

$$LQ = \frac{10.DP}{B} \quad \text{equação 4}$$

### 3.8 - Comparação da metodologia proposta para a determinação de TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas com o método oficial.

Os métodos oficiais são descritos na Farmacopeia Brasileira para o doseamento em formulações farmacêuticas e, no geral, são métodos baseados em técnicas espectrofotométricas e cromatográficas.

O método oficial é descreve o doseamento da TF utilizando comprimidos de aminofilina e é baseado na a detecção por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, neste caso foi preciso pesar e pulverizar até a obtenção de um pó fino, 20 comprimidos. Transferiu-se a quantidade de pó 72 mg dos comprimidos de TF (quantidade presente em 80 mg de aminofilina  $[(C_7H_8N_4O_2)_2.C_2H_8N_2]$  que é proposta pelo método oficial), para balão volumétrico de 200 mL. Adicionar 20 mL de hidróxido de sódio 0,1 M e 60 mL de água e agitar mecanicamente por 10 minutos. Completar o volume com água, homogeneizar e filtrar. Transferir 5 mL do filtrado para balão volumétrico de 200 mL e completar o volume com hidróxido de sódio 0,01 M SV, obtendo concentração de 0,001% (p/v). Medir a absorvância da solução resultante em 275 nm, utilizando hidróxido sódio 0,01 M SV para ajuste do zero. Calcular a quantidade de teofilina nos comprimidos considerando  $A(1\% \text{ } 1 \text{ cm}) = 650$ , em 250 nm, em hidróxido sódio 0,01 M SV. (Farmacopeia Brasileira,pg.:617-618).

O método da CM é baseado em cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta que foi utilizado Utilizar cromatógrafo provido de detector ultravioleta a 210 nm; coluna de 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro interno, empacotada com sílica quimicamente ligada a grupo octadecilsilano (5 $\mu$ m); fluxo da Fase móvel de 1,5 mL/minuto. Foi preparado o tampão fosfato com 6,8 g de fosfato de potássio monobásico em 950 mL de água, com o pH ajustado em 7,5 com hidróxido de potássio a 25% (p/v) e diluir para 1000 mL com água. A fase móvel foi o tampão fosfato e acetronitrila na proporção de 55:45, respectivamente (Farmacopeia Brasileira, pg.: 819-820).

O método oficial da VF é a espectrofotometria de absorção no ultravioleta, foi realizado o seguinte procedimento, transferiu-se, exatamente, cerca de 0,1 g da amostra para balão volumétrico de 100 mL, dissolveu e completou o volume com hidróxido de sódio 0,01 M. a solução foi diluída, sucessivamente, até concentração de 0,001 % (p/v). A solução padrão de VF foi preparada na mesma concentração, utilizando o mesmo solvente. A absorvâncias das soluções resultantes foram medida no comprimento de onda de 308 nm, utilizando hidróxido de sódio 0,01 M para ajuste do zero. Calculou o teor de VF na amostra a partir das leituras obtidas (Farmacopeia Brasileira, pg.:1374).

Para o VP o método oficial é a espectrofotometria de absorção no ultravioleta a execução do procedimento deu início com a pesagem e a pulverização de 20 comprimidos em seguida transferiu-se a quantidade de pó equivalente a 100 mg de cloridrato de verapamil para balão volumétrico de 250 mL e dissolveu em ácido clorídrico 0,01 M, com agitação. Foi completado o volume do balão com o mesmo solvente. Em seguida filtrou e transferiu 10mL do filtrado para o balão volumétrico de 100 mL e completou o volume com ácido clorídrico 0,01 M. O preparo da solução padrão foi realizada nas mesmas condições. As absorvâncias das soluções foram medidas no comprimento de onda de 278 nm, utilizando ácido clorídrico 0,01 M para ajuste do zero. O cálculo da quantidade de VP nos comprimidos foi realizado a partir das leituras obtidas (Farmacopeia Brasileira, pg.: 874-875).

### **3.9– Uso da seringa descartável em substituição a micropipeta automática.**

Os fármacos TF, CM e VF foram avaliados para o estudo do uso da seringa em substituição a micropipeta automática. Neste estudo foram realizados os mesmos procedimentos utilizados com a micropipeta automática. Porém, as análises da velocidade e volume de injeção não foram realizadas, uma vez que, a velocidade de injeção depende exclusivamente do operador e o mesmo deve testar e identificar a melhor maneira de injeção. Necessita-se estabelecer uma injeção lenta, média e rápida; e a partir destes parâmetros identificar como proceder durante toda a análise. O volume de injeção não foi estudado por optar-se pelo uso total do volume da seringa (300µL), que é encontrada facilmente no mercado.

## 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 - Considerações gerais

Os resultados e discussões deste trabalho serão divididos em dois capítulos. No primeiro capítulo serão apresentados e discutidos os resultados associados ao desenvolvimento do método proposto para determinação de TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas utilizando a micropipeta automática. No segundo capítulo serão abordados os resultados utilizando a seringa descartável usada para substituir a micropipeta automática na determinação de TF, CM e VF em formulações farmacêuticas.

### 4.2 - Capítulo 1 – Estudo MPA-BIA utilizando a micropipeta automática

#### 4.2.1 – Comportamento eletroquímico da TF, CM, VF e VP.

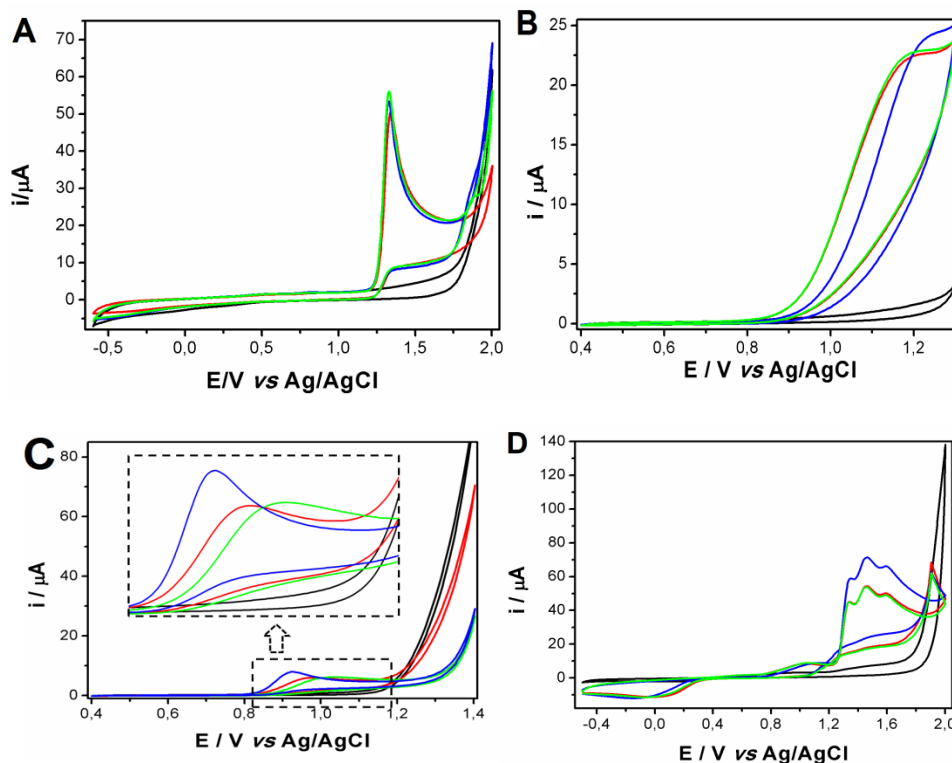
O comportamento eletroquímico dos fármacos sobre o eletrodo de DDB foi previamente avaliado pelo grupo de pesquisa em diferentes valores de pH e eletrólitos suporte (tampão Britom- Robson por meio da VC, porém esses estudos iniciais foram relatados em outros trabalhos para determinação desses compostos por detecção MPA acoplado ao sistema FIA (DOS SANTOS *et al.*, 2015). Como esses estudos de pH e eletrólito, em princípio, não influenciam na detecção MPA quando acoplada ao sistema FIA ou BIA, o presente trabalho aproveitou esses resultados para otimização dos demais parâmetros. A Figura 9 mostra os voltamogramas cíclicos nos respectivos eletrólitos e pH escolhidos, sendo o  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH}_{\text{aparente}} 1,0$ ) para TF, o tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) para CM, o tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) com 10% de álcool etílico para VF, e  $\text{H}_2\text{SO}_4$  a  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  ( $\text{pH}_{\text{aparente}} 0,7$ ) para VP.

Como já relatado na literatura, a superfície do eletrodo de DDB pode influenciar no comportamento eletroquímico das espécies eletroativas, tanto na corrente como no potencial de pico dos processos redox (SALAZAR-BANDA *et al.*, 2010). A superfície do eletrodo de DDB pode ser alterada de acordo com o pré-tratamento eletroquímico aplicado neste material, podendo ser realizado dois tratamentos: o anódico que deixa a superfície do DDB terminada em oxigênio (devido à oxidação da água) e com afinidade por moléculas mais hidrofílicas; e o catódico onde a terminação na superfície será por hidrogênio (devido à redução da água), tendo esta uma maior afinidade por moléculas mais hidrofóbicas. Nesse sentido, foi avaliado para todos os fármacos o comportamento eletroquímico, nos respectivos eletrólitos suporte, sem tratamento, com tratamento catódico e com tratamento anódico da



superfície do eletrodo DDB (vs Ag/AgCl). Estes resultados são também apresentados na Figura 9.

**FIGURA 9:** Voltamogramas Cíclicos em (A) do eletrólito  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (—) sem e com TF  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  sem tratamento (—), após tratamento catódico (—) e após tratamento anódico (—). Em (B) do eletrólito tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 (—), sem e com CM  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  sem tratamento (—), após tratamento catódico (—) e após tratamento anódico (—). Em (C) do eletrólito tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em pH 7,0 e 10 % de álcool etílico (—), sem e com VF  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  sem tratamento (—), após tratamento catódico (—) e após tratamento anódico (—). Em (D) do eletrólito  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  (—), sem e com VP  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  sem tratamento (—), após tratamento catódico (—) e após tratamento anódico (—). Todos os voltamogramas dos respectivos fármacos foram obtidos com velocidade de varredura:  $50 \text{ mV s}^{-1}$ .

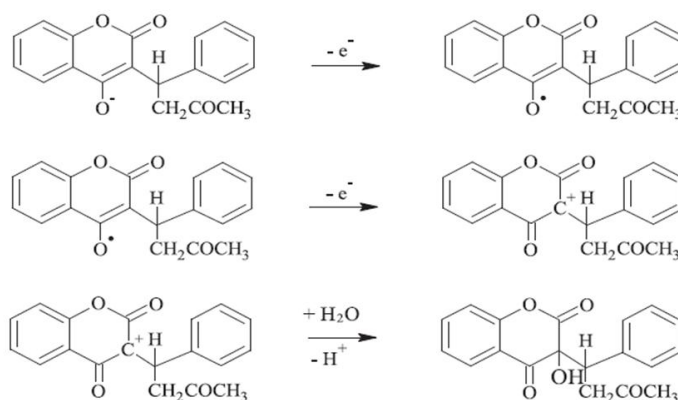


Os voltamogramas cíclicos da Figura 9A mostram que um processo de oxidação irreversível para TF com potencial de pico em  $+1,33 \text{ V}$  (vs Ag/AgCl, KCl) em todos os casos observados (sem tratamento, após tratamento catódico e anódico). De acordo com o trabalho de Spătaru e colaboradores, esse comportamento já era previsto para detecção eletroquímica desse composto, mediante a utilização do DDB. A oxidação é proveniente da perda de quatro elétrons e quatro prótons do grupo amina secundária, que está presente na estrutura da TF (SPATARU *et al.*, 2002). A Figura abaixo mostra o mecanismo de oxidação proposto por Spătaru e colaboradores.



deslocamento do potencial para valores menores (+0,9V), o que justifica a escolha deste tratamento no processo de otimização do método proposto. Este processo de oxidação também foi observado por Gholivand e colaboradores com perda de dois elétrons e um próton, utilizando como eletrodo de trabalho o pasta de carbono modificado com nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (GHOLIVAND, TORKASHVAND e YAVARI, 2015). Na Figura 11 é demonstrado o mecanismo do processo de oxidação da VF proposto por esses autores.

**FIGURA 11:** Reação de oxidação da VF.



**Fonte:** (GHOLIVAND, TORKASHVAND E YAVARI, 2015)

Na Figura 9D é observado o comportamento eletroquímico do VP, onde pode ser constatado três processos de oxidação no intervalo de potencial de +1,2V a +1,5V e um processo de redução em torno do potencial +0,2V. Após a primeira varredura de potencial, outro processo de oxidação em torno de +0,9V é observado para o VP, o qual só pode ser verificado nesta Figura 9D, uma vez que, estes voltamogramas apresentados são referentes à segunda varredura de potencial obtida pela VC. Todavia, de acordo com os trabalhos encontrados na literatura, apenas um processo de oxidação e um de redução são observados para VP nos eletrodos de trabalho de nanotubos de carbono de paredes múltiplas imobilizada em eletrodo de carbono vítreo, carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono multicamadas aplicados dentro do filme de poli (cloridrato de alilamina), pasta de carbono modificado com ácido sulfônico funcionalizada sílica mesoporosa magnético o nanoeletrodo de ouro incorporado a um microchip (CHAMJANGALI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2013; HASANZADEH *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2013).

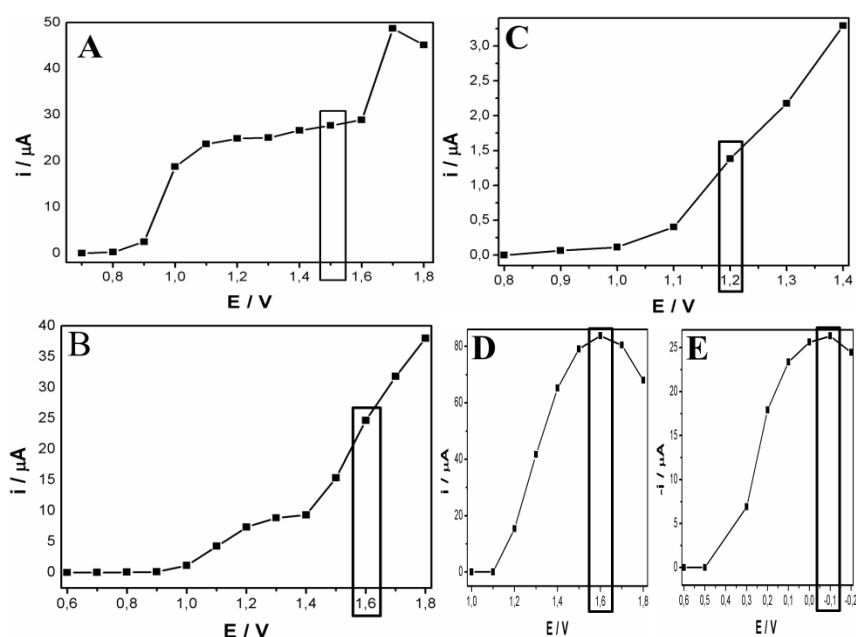
Cabe ressaltar que os estudos para confirmação dos mecanismos eletroquímicos da CM, VF e VP sobre o eletrodo de DDB ainda estão sendo realizados pelo grupo de pesquisa.

#### 4.2.2 – Otimização dos pulsos de potencial e tempo de aplicação na detecção MPA

A partir dos estudos voltamétricos dos analitos no DDB foi realizada a otimização dos parâmetros de detecção da técnica MPA no que se refere aos pulsos de potencial e tempo de aplicação destes para a detecção de cada fármaco, visando à obtenção de melhores condições para a sensibilidade, seletividade, repetibilidade e frequência analítica da metodologia.

Para a escolha do potencial de detecção da TF, CM, VF e VP foi selecionado uma faixa de potencial de acordo com o perfil de cada fármaco evidenciado nos voltamogramas cíclicos mostrados anteriormente. Toda a análise destes potenciais foi realizada com o volume de injeção de 100  $\mu\text{L}$  e com velocidade de injeção de aproximadamente 100  $\mu\text{L s}^{-1}$ . A Figura 12 mostra os voltamogramas hidrodinâmicos (sinal de corrente versus o potencial aplicado) referentes a cada estudo de potencial dos fármacos.

**FIGURA 12:** Voltamogramas hidrodinâmicos para escolha dos potenciais obtidos pela detecção MPA, em (A) para oxidação da TF; em (B) para oxidação da CM, em (C) para oxidação da VF, em (D) para oxidação do VP e, posteriormente, estudo da potencial para redução do produto gerado do VP em 1,6 V (E). Os tempos de duração dos pulsos de potencial de oxidação foram fixados primeiramente em 100 ms para todos os estudos. Todos analitos foram realizadas em triplicata com soluções padrão dos analitos a  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ .



Como pode ser observado na Figura 12A, o sinal de oxidação da TF é perceptível já no potencial +1,0V e aumenta até o potencial +1,7V, diminuindo a partir deste pulso de potencial, conforme mostrado na Figura 12A em +1,8 V, provavelmente, devido ao aumento da corrente capacitiva acima deste valor de potencial. Dessa forma, o potencial escolhido para a otimização do método proposto foi em +1,5V, mesmo este não sendo o maior sinal de

corrente obtido, uma vez que, a sensibilidade deste é suficiente para a análise da TF em formulações farmacêutica. O pico de corrente apresentou um sinal transiente com tempo de duração do pulso de potencial em 100 ms. Além disso, valores menores que 100 ms não mostram grande diferença no sinal obtido e uma maior corrente capacitiva ainda era observada. Em tempo de duração maiores que 100 ms, a corrente de pico foi menor e os sinais obtidos já apresentavam distorções devido à falta de aquisição de pontos. Esses resultados (não mostrados) foram semelhantes para os fármacos CM e VF e estão de acordo com o previsto pela revisão sobre detecção MPA dos Santos e colaboradores dos santos (DOS SANTOS *et al.*, 2011). Deste modo, o tempo de aplicação do pulso de potencial foi otimizado em 100 ms para detecção tanto da TF, quanto para CM e VF.

Na Figura 12B é notado o sinal de oxidação da CM no potencial +1,0V, que tem o valor de corrente crescendo até o +1,3V, e deste potencial para o +1,4V não se tem um aumento significativo, porém, logo em seguida há novamente um aumento até o potencial avaliado de +1,8 V. Já na Figura 12C a partir de +1,0V o sinal de corrente de oxidação da VF aumenta à medida que o potencial aplicado torna-se maior, no entanto o álcool etílico presente no eletrólito de suporte em os potenciais acima de +1,4V pode ser um possível interferente nas análises. Visto que a CM e VF serão analisadas em formulações farmacêuticas, o potencial para execução dos estudos da determinação destes analitos foi em +1,6V e +1,2 V, respectivamente, pelo mesmo motivo explicado para TF. É importante ressaltar que, quando mais baixo o potencial aplicado maior a seletividade da técnica, impossibilitando que algum excipiente da amostra interfira nas análises.

O sinal da oxidação do VP só é perceptível a partir de +1,2V e vai aumentando gradativamente com ápice em +1,6V, depois diminui até +1,8V (Figura 12D). Referente ao sinal da corrente de redução (Figura 12E), do produto gerado pela oxidação do VP, pode-se notar que a partir +0,5 V o processo já é observado e tem o maior valor de corrente no potencial de -0,1V, diminuindo após este valor. Vale lembrar que, o sinal de corrente da redução do VP pode ser uma alternativa para a detecção do mesmo em fluidos biológicos, como a urina, onde os maiores interferentes são o ácido ascórbico e o ácido úrico que não apresentam redução sobre o eletrodo de DDB nestas condições (GUEDES *et al.*, 2016). Como a redução é dependente do produto da oxidação, no caso do VP, é necessário gerar uma maior quantidade de VP para se obter um maior sinal de redução. Por este motivo o potencial que apresentou maior valor de corrente na oxidação +1,6V (pulso de potencial gerador) e o de maior de redução -0,1V (pulso de potencial coletor) foram escolhidos para o estudo de

determinação deste fármaco, visando sua aplicação tanto em formulações farmacêuticas quanto em urina. Em relação ao tempo de aplicação do pulso de potencial gerador e coletor, primeiramente, foi fixado o tempo do pulso de potencial coletor em 100 ms e avaliado o tempo do pulso de potencial gerador de 30 a 500 ms. O tempo que apresentou maior corrente de pico de redução foi de 50 ms e este foi selecionado para o pulso de potencial gerador. Embora quantidade de produtos oxidados fosse maior em tempos superiores a 50 ms no pulso de potencial gerador, a agitação vigorosa no sistema BIA pode ter retirados esses produtos da superfície do DDB para detecção. No caso do tempo do pulso de potencial coletor (quantificação do VP), o menor tempo possível foi selecionado para evitar que o produto fosse retirado da superfície do eletrodo antes deste ser detectado, no caso do software utilizado, 30 ms foi escolhido para detecção em -0,1 V.

#### **4.2.3 – Otimização do volume de injeção e das velocidades de injeção no sistema BIA**

Com o intuito de obter as melhores condições para análise dos fármacos no sistema BIA, como o volume de injeção, velocidade de injeção e de agitação da solução dentro da célula foram otimizados.

O volume de injeção foi variado de 10, 50, 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu\text{L}$  para cada fármaco (injeções em triplicata). Para a escolha do volume de injeção, estabeleceu-se como critério a média da intensidade do sinal da corrente, ou seja, o volume que apresentasse maior média seria adotado para a realização dos demais estudos. Entretanto, após a análise das médias de todos os volumes, foi notado que a partir do volume 100  $\mu\text{L}$  não há aumento significativo do sinal. Neste sentido, a escolha de volumes maiores não seria pertinente para o estudo da TF, CM, VF e VP. A seleção pelo volume 100  $\mu\text{L}$  proporcionou ao método proposto um ganho de frequência analítica e evitou o gasto desnecessário de reagentes.

A velocidade de injeção foi avaliada (injeções em triplicata) na ordem crescente dos níveis de velocidade da micropipeta que variam de 16  $\mu\text{L s}^{-1}$  (nível 1) a 156  $\mu\text{L s}^{-1}$  (nível 10) com a concentração de todos os fármacos em  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . A velocidade ideal para as análises foi a que apresentou maior intensidade do sinal de corrente, assim a velocidade de 100  $\mu\text{L s}^{-1}$  (nível 7) foi escolhida para a detecção de TF, CM, VF e, no caso do VP, uma velocidade menor de 47  $\mu\text{L s}^{-1}$  (nível 3) foi escolhida devido à questão do VP ser quantificado pelo produto gerado.

#### 4.2.4 – Otimização da velocidade de agitação.

A velocidade de agitação é necessária para melhorar a difusão das espécies da superfície do ET para a o eletrólito presente no interior da célula, proporcionando uma maior frequência analítica para o método.

Como o motor de agitação da célula BIA utilizado nessa pesquisa foi fabricado de forma artesanal, não foi possível a mensuração da velocidade de agitação. Porém o motor foi eletricamente conectado a uma fonte universal AC / DC que não permite escolher uma tensão x de saída por que esta fonte tem uma faixa de voltagem de 0V à 9V sem uma escala de voltagem como em outros modelos não permitindo assim uma mais precisa da voltagem correspondente a velocidade do motor. Quanto maior a voltagem, mais intensa foi a agitação da solução e, com isso, estabeleceu a seleção da velocidade (obtida na faixa de voltagem) na qual foi observado o retorno do sinal analítico para a “linha de base” em menor tempo e sem a provocação de ruídos no sistema. Para todos os fármacos a velocidade de agitação foi verificada e voltagem (aproximadamente 4,5) selecionada com este mesmo critério para a TF, CM e VF, para o VP a velocidade foi um pouco menor correspondendo assim a uma voltagem de aproximadamente 3V.

#### 4.2.5 – Otimização do potencial de limpeza.

Em estudos anteriores em sistema FIA-MPA utilizando o eletrodo de DDB, para os mesmos analitos investigados neste trabalho, mostraram que além dos pulsos de potencial para detecção dos fármacos, mais um pulso de potencial fazia-se necessário para limpeza da superfície do eletrodo. Para o estudo do pulso de potencial de limpeza aplicado em cada caso, foram testados pulsos de potencial maiores e menores que os escolhidos como pulso de potencial de detecção para a TF, CM, VF e VP. O tempo de aplicação do pulso de potencial de limpeza de 100 ms foi utilizado para todos os casos estudados e como os valores obtidos do DPR foram menores que 5 %, conforme recomendado pela ANIVSA, tempos maiores não foram avaliados. A Tabela 7 apresenta os valores dos pulsos de potencial de limpeza ( $E_l$ ) e os valores de DPR.

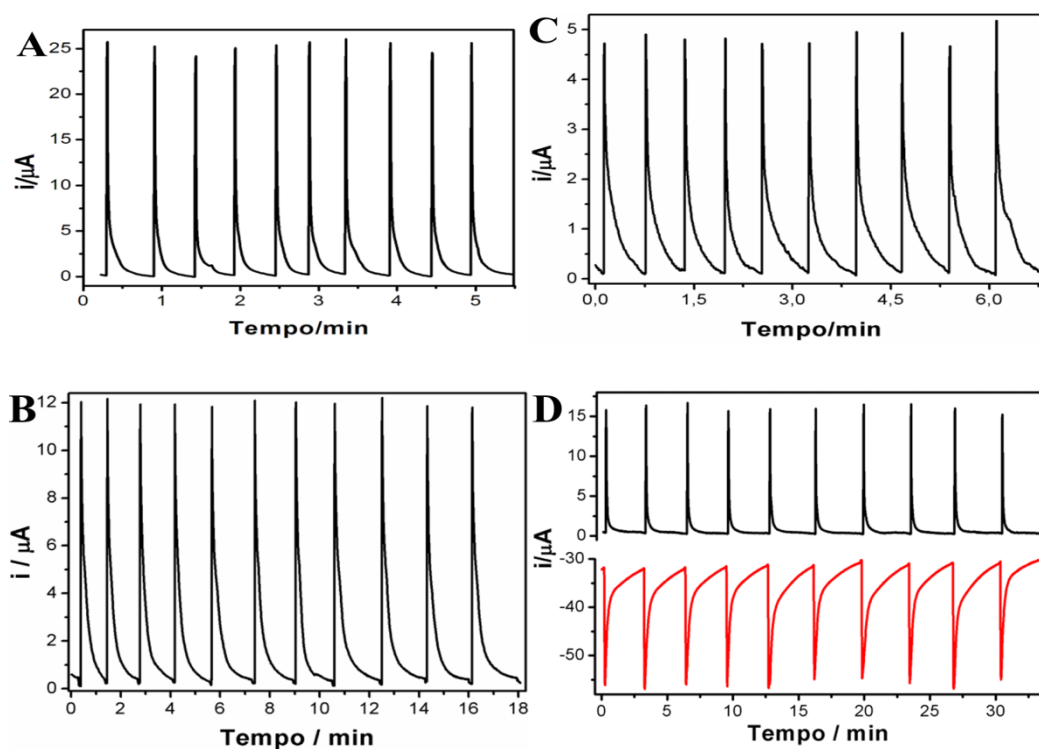
**TABELA 7:** Valores dos potenciais de limpeza dos fármacos TF, CM, VF e VP.

	<b>Fármacos</b>			
	<b>TF</b>	<b>CM</b>	<b>VF</b>	<b>VP</b>
<b><math>E_l</math> (V)</b>	+1,7	+0,5	-0,2	+1,1 V
<b>DPR (%)</b>	2,18	2,70	1,00	2,79 ( $E_{\text{gerador}}$ ) 2,66 ( $E_{\text{coletor}}$ )

#### 4.2.5 – Ensaios de repetibilidade e determinação da faixa linear de trabalho

Após todos os parâmetros da detecção MPA-BIA otimizados, a repetibilidade foi investigada e avaliada pelo valor do desvio padrão relativo (DPR) de 10 medidas do sinal de corrente de pico de cada fármaco. De acordo com a RDC 899/2003 da ANVISA, o valor do DPR de seis medidas de uma única concentração precisa ser menor que 5%. selecionado e do DPR obtidos para detecção de da TF, CM, VF e VP foram todos menores que o exigido pela ANVISA (Tabela 7). A Figura 13 mostra as 10 medidas sequenciais dos fármacos, todos a  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , onde pode ser constatado que durante as análises a superfície do DDB não está sendo contaminada ou passivada de forma significativa, demonstrando assim, a eficiência do pulso potencial de limpeza aplicado.

**FIGURA 13:** Amperograma, Repetibilidade, (A) TF potencial de oxidação 1,5V/100 ms e limpeza 1,7V/100ms, (B) CM potencial de oxidação 1,6V/100ms e limpeza 0,5V/100ms, (C) VF potencial de oxidação 1,2V /100ms e limpeza -0,2V/100ms, (D) VP potencial de oxidação 1,6 V/50 ms, redução -0,1V/30 ms e limpeza 1,1V/100ms.



Como pode ser observado na Tabela, o pulso de potencial de limpeza do VP foi escolhido em +1,1 V, que está entre o potencial gerador de (+1,6 V) e o coletor (-0,1 V). Neste caso, como pode ser observado pelo voltamograma do VP na Figura 9D, após a redução (do produto gerado) em -0,1 V tem-se mais um espécie eletroativa na superfície do eletrodo em torno de 0,9 V. No caso da detecção no sistema BIA-MPA foi verificado que uma repetibilidade menor que 5 % somente era alcançada quando uma oxidação prévia deste

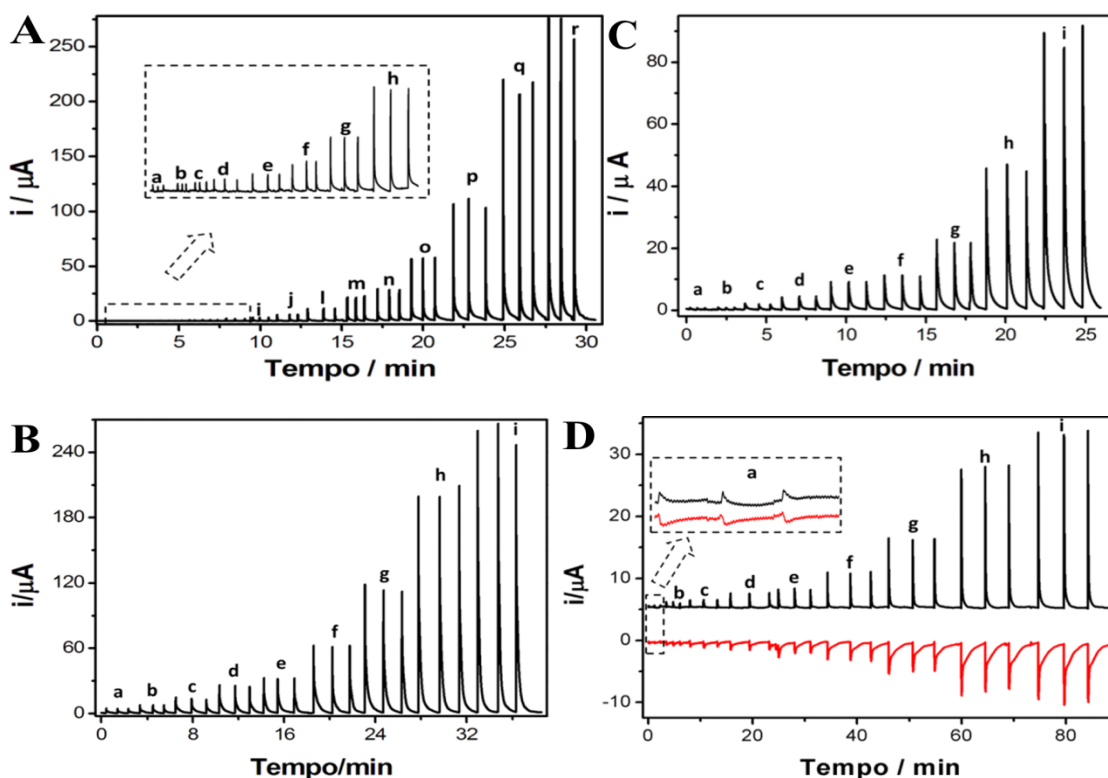


produto fosse realizada. Dessa forma, pulsos de potencial de limpeza foram avaliados entre o pulso gerador e coletor, e o pulso de potencial de limpeza em +1,1 V foi escolhido com menor DPR.

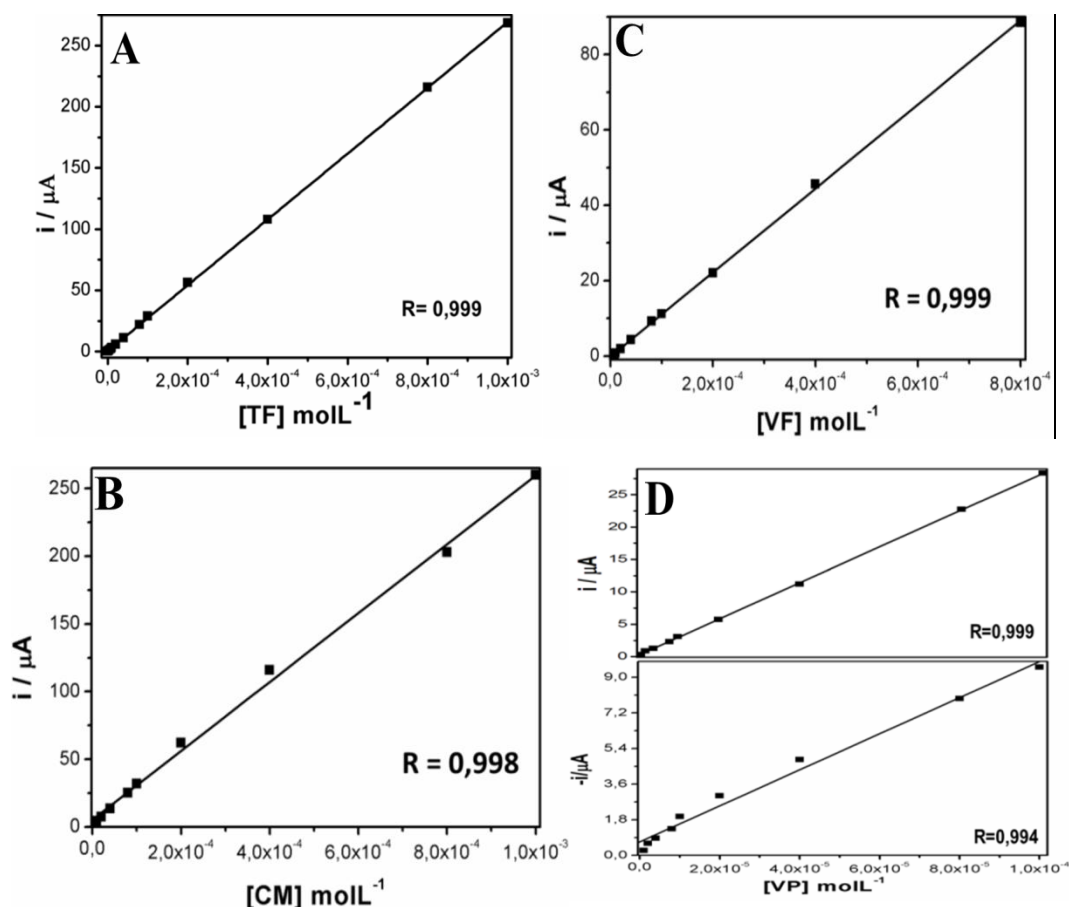
#### 4.2.5 – Estudo da Faixa linear de trabalho e dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O estudo da faixa linear de trabalho foi obtida através das injeções em triplicata de soluções padrão nas concentrações de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  pelo sistema BIA-MPA, conforme mostrado na Figura 14. O intervalo das concentrações que apresentou linearidade foi para TF de  $1,0 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , para CM de  $1,0 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , para o VF de  $8,0 \times 10^{-6}$  a  $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e para VP de  $1,0 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , cujos resultados são apresentados na curva de calibração obtida pelos amperogramas na Figura 15.

**FIGURA 14-** BIAgrama com detecção MPA sob DDB das faixas lineares em (A) TF de  $a=1,0 \times 10^{-7}$  a  $r=1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , (B) CM de  $a=1,0 \times 10^{-5}$  a  $i=1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , (C) VF de  $a=8,0 \times 10^{-6}$  a  $i=8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e em (D) VP de  $a=1,0 \times 10^{-6}$  a  $i=1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ .



**FIGURA 15** - Curvas de regressão linear provenientes dos amperogramas da Figura 14 dos fármacos (com os coeficientes de correlação lineares inseridos) em (A) para TF, (B) para CM, em (C) para VF e em (D) para a detecção do VP pelo potencial gerador e coletor.



Os resultados obtidos pelas regressões para todos os fármacos apresentaram uma boa faixa linear com pelo menos duas ordens de magnitude e coeficiente de correlação maior que 0,99 o que está dentro do recomendado pela ANVISA para validação de uma metodologia. As equações das retas das respectivas regressões lineares de cada fármaco são apresentadas abaixo:

$$i(A) = 4,400 \times 10^{-7} (\pm 2,180 \times 10^{-7}) + 0,268 (\pm 0,661) A \text{ mol}^{-1} L^{-1} (1) \text{ para TF}$$

$$i(A) = 5,552 \times 10^{-6} (\pm 2,162 \times 10^{-6}) + 0,254 (\pm 4,76 \times 10^{-9}) A \text{ mol}^{-1} L^{-1} (2) \text{ para CM}$$

$$i(A) = -7,900 \times 10^{-8} (\pm 2,190 \times 10^{-7}) + 0,122 (\pm 7,106 \times 10^{-10}) A \text{ mol}^{-1} L^{-1} (3) \text{ para VF}$$

$$i(A) = 1,300 \times 10^{-7} (\pm 5,400 \times 10^{-8}) + 0,282 (\pm 1,182 \times 10^{-3}) A \text{ mol}^{-1} L^{-1} (4) \text{ para VP}_{(ox)}$$

$$i(A) = 6,840 \times 10^{-7} (\pm 1,740 \times 10^{-7}) + 0,091 (\pm 3,844 \times 10^{-3}) A \text{ mol}^{-1} \text{L}^{-1} \quad (5) \quad \text{para VP}_{(\text{re})}$$

Por meio da sensibilidade obtida pelas equações das retas e dos ruídos dos amperogramas da Figura 14, o LD e LQ foram calculados como descrito no item 3.7. A Tabela 8 mostra os LD e LQ encontrados para cada fármaco.

**TABELA 8:** LD e LQ da TF, CM, VF e VP (para o potencial de oxidação (ox) e redução (re)).

	TF	CM	VF	VP(ox re)
<b>LD</b>	$8,623 \times 10^{-9}$	$7,777 \times 10^{-7}$	$2,448 \times 10^{-7}$	$7,580 \times 10^{-8}   7,173 \times 10^{-8}$
<b>LQ</b>	$2,874 \times 10^{-8}$	$2,598 \times 10^{-6}$	$8,162 \times 10^{-7}$	$2,526 \times 10^{-7}   2,391 \times 10^{-7}$

#### 4.2.6 - Ensaio de adição e recuperação em amostras farmacêuticas.

As porcentagens do estudo de adição e recuperação em amostras farmacêuticas dos fármacos foram obtidas após a elaboração de novas curvas de calibração dos analitos dentro da faixa linear estudada anteriormente. Os resultados da recuperação para a TF, CM, VF e VP estão demonstrados na Tabela 9.

**TABELA 9:** Resultados do estudo de adição e recuperação dos fármacos TF, CM, VF e VP.

Amostras (Princípio Ativo)	Adição (mg)	Encontrado (mg)	Recuperação (%)
TF	5,40	5,64	104,40 $\pm$ 1,44
CM	17,00	17,10	100,75 $\pm$ 0,78
VP	1,96	2,03	103,22 $\pm$ 1,32

Para a VF a faixa de concentração foi de  $2,0 \times 10^{-5}$  a  $2,0 \times 10^{-4} \text{ molL}^{-1}$ , a concentração da amostra foi a mesma da teórica do padrão de  $4,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$  a concentração da solução mistura foi de  $8,0 \times 10^{-5} \text{ molL}^{-1}$ . O cálculo para o fármaco VF foi através da diferença da média dos sinais analíticos do fármaco mais padrão e do fármaco, assim obteve-se uma porcentagem de recuperação de  $98,12\% \pm 1,21$ . Todas as formulações farmacêuticas continham somente o fármaco a ser analisado, ou seja, não estavam associados com outros fármacos.

Os resultados apresentados na Tabela 9 para recuperação de cada fármaco ficaram em torno de 100 %, indicando a ausência do efeito de matriz nas amostras analisadas. Além disso, esses resultados comprova a eficiência do método proposto, conforme a RDC 899/2003 da ANVISA, a qual determina que o estudo de adição e recuperação para validação de um novo método em formulações farmacêuticas deve estar entre 95% a 105%.

#### 4.2.6 - Comparação da metodologia proposta para a determinação de TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira.

Neste estudo, foram utilizados formulações farmacêuticas de TF, CM, VF e VP. É importante ressaltar que, cada fármaco tem um método oficial já preconizado pela Farmacopeia Brasileira, sendo para TF, VF e VP por meio da espectrofotometria de absorção no ultravioleta e para CM por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção também no ultravioleta (Farmacopeia Brasileira, pg.:617-618; Farmacopeia Brasileira, pg.:1374 Farmacopeia Brasileira, pg.: 874-875; Farmacopeia Brasileira, pg.: 819-820). Os resultados destes estudos estão relacionados na Tabela 10.

**TABELA 10:** Doseamento para a determinação de TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas pelo método proposto e pela metodologia oficial. Os valores após o  $\pm$  são os desvio padrão da análise em triplicata de cada amostra.

<b>Medicamentos (princípio ativo)</b>	<b>Rotulado (mg)</b>	<b>BIA-MPA (mg)</b>	<b>Método Oficial (mg)</b>
TF	100	89,7 $\pm$ 1,2	90,9 $\pm$ 0,3
CM	300	337,0 $\pm$ 9,5	344,8 $\pm$ 0,9
VF	5,0	5,2 $\pm$ 0,07	5,3 $\pm$ 0,09
VP	80,0	81,2 $\pm$ 0,9	81,8 $\pm$ 0,1

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 10, para os medicamentos com TF e CM, tanto o BIA-MPA quanto o método oficial dos mesmos apresentou resultados de doseamento bastante diferente do estabelecido pelo fabricante. Para a VF e VP os resultados foram próximos ao rotulado. Cabe destacar que, o doseamento de um medicamento é dado pela porcentagem em relação ao valor rotulado (100 %), sendo os limites de erros permitidos dependentes para cada princípio ativo. No caso, segundo a farmacopeia brasileira, o limite de doseamento destes fármacos é dado em  $\pm 110,2$ , 110,0, 102,0 100,5% (Farmacopeia Brasileira, 2010) para TF, CM, VF, e VP, respectivamente. O doseamento encontrado foi na média pelos dois métodos de 89,4, 113,8, 105,0 e 101,9%, para os fármacos, TF, CM, VF e VP, respectivamente. No entanto, não cabe a este trabalho avaliar essa questão de fiscalização dos medicamentos, visto que o objetivo do mesmo é apenas propor um método mais simples e rápido para quantificação destes compostos. Nesse sentido, nota-se que os valores de doseamento dos respectivos fármacos obtidos pelo BIA-MPA ficaram próximos aos do método oficial e para que fosse atestada a semelhança entre os

métodos proposto foram aplicados os testes estatísticos *F* e *t*. O intervalo de confiança de 95% foi adotado para estes testes e os resultados são apresentados na Tabela 11.

**TABELA 11:** Resultados dos testes *F* e *t* com intervalo de confiança de 95% para  $n = 3$ .

Analito	Teste <i>F</i>		Teste <i>t</i>		Parecer Estatístico
	Valor Calculado	Valor Crítico	Valor Calculado	Valor Crítico	
TF	16,00	19,00	2,02	2,78	Semelhante
CM	111,	19,00	1,37	2,78	Não semelhante
VF	1,65	19,00	1,73	2,78	Semelhante
VP	8.100,00	19,00	0,1343	2,78	Não semelhante

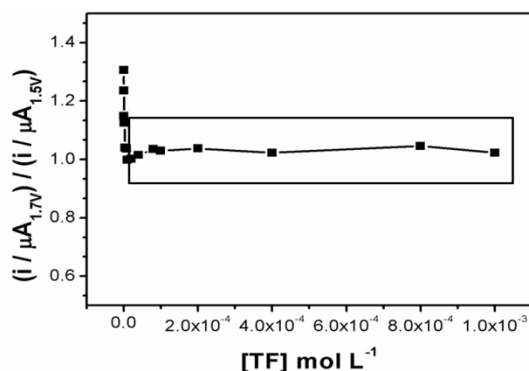
Os resultados da Tabela 11 comprovam a eficiência do método BIA-MPA para a determinação da TF e VF em formulações farmacêuticas, tanto quanto a sua precisão, atestado pelo teste *F*, como para sua exatidão, pelo teste *t*, ambos indicando uma semelhança entre os resultados obtidos pelo método proposto e o oficial, tornando-o assim uma alternativa promissora no controle de qualidade destes medicamentos. No entanto para os fármacos CM e VP na precisão, atestado pelo teste *F* o método proposto não obteve resultados satisfatórios, mostrando que esse método não é semelhante com o método oficial, no entanto é valido lembrar que o estudo de adição e recuperação também é utilizado como parâmetro de validade do método. Além disso, foi verificada a possibilidade de usar a detecção BIA-MPA para fazer uma análise qualitativa dos fármacos pela razão dos sinais obtidos em dois pulsos de potencial de detecção diferentes, conforme apresentando as seguir.

#### 4.2.7 – Estudo da razão dos sinais entre os potenciais +1,7V e +1,5V da TF

Este estudo foi realizado com o intuito de adquirir uma análise qualitativa da matéria prima e do produto final de um determinado fármaco, atestando sua pureza na formulação farmacêutica. A ideia é baseada no comportamento eletroquímico (potencial e corrente) particular de cada composto sobre um determinado eletrodo e condições eletrolíticas, onde a razão entre os sinais de corrente (de oxidação e/ou redução) obtidos pelos pulsos de potencial de um composto eletroativo seria sempre igual numa determinada faixa de concentrações. Porém, caso estivesse presente algum interferente eletroativo na formulação, a razão seria diferente da obtida pelo padrão do fármaco, indicando um erro na composição do medicamento. Partindo desse pressuposto, foi estudada a razão dos sinais dos potenciais de +1,7V e +1,5V para TF em uma faixa de concentração de  $4,0 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ molL}^{-1}$  (faixa

linear obtida anteriormente) com injeções em triplicata de solução padrão em meio eletrólito de suporte  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1\text{molL}^{-1}$ . A Figura 16 mostra razão da média dos sinais dos potenciais citados para cada concentração na faixa avaliada.

**FIGURA 16:** Gráfico das Razões entre os sinais (corrente) dos potenciais  $+1,7\text{V}$  e  $+1,5\text{V}$  versus as concentrações de TF de  $4,0 \times 10^{-7}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{mol L}^{-1}$ .



De acordo com a Figura 16, é possível notar uma razão constante ( $1,026 \pm 0,016$ ) na faixa de concentração de  $8,0 \times 10^{-5}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{molL}^{-1}$ , indicando que nesta faixa há uma possibilidade de analisar a pureza da TF qualitativamente. Para comprovação da eficiência do método foi realizado um estudo onde é comparada (injeções em triplicata) a razão da média dos sinais nos potenciais  $+1,7\text{V}$  e  $+1,5\text{V}$  da solução padrão de TF com um medicamento contendo a TF (TFAm), e padrões de eventuais compostos eletroativos que poderiam estar presentes, como a CM, paracetamol (PC), colchicina (CO), aminofilina (AMI: que é uma associação de TF com etilenodiamina) e as misturas da TF com CM (TFCM) e ácido ascórbico (AA) (TFAA). Todas as soluções tem a concentração total de medicamento em  $1,0 \times 10^{-3} \text{molL}^{-1}$ . A Tabela 12 mostra os valores obtidos para a razão da média dos sinais em todas as soluções.

**TABELA 12:** Comparação das razões da média dos sinais nos potenciais  $1,7\text{V}$  e  $1,5\text{V}$  das soluções a  $1 \times 10^{-3} \text{molL}^{-1}$  de TF<sub>p</sub>, TF<sub>Am</sub>, CM, PC, CO, AMI, TFCM e TFAA.

Razão	Fármacos							
	TF <sub>p</sub>	TF <sub>Am</sub>	CM	PC	AMI	CO	TFCM	TFAA
	1,031	0,965	1,478	1,010	1,013	1,261	1,192	1,053

Na Tabela 12 nota-se que os valores das razões da TF<sub>Am</sub>, PC, AMI, TFCM e TFAA são relativamente próximos do valor da TF. Como previsto o valor da razão da TF<sub>Am</sub> foi próximo da TF padrão, uma vez que os excipientes presentes no medicamento não interferem na análise. No entanto, esperava-se que para as demais soluções esses valores fossem bastante diferentes, pois os pulsos de potencial que foram aplicados são suficientes

para oxidação do PC, CM e AA. Neste caso, a análise qualitativa da TF não pode ser realizada simplesmente pela razão entre os dois potenciais. Além disso, quanto a TF estava presente com outro composto não-eletoativo na mistura, como no caso da etilenodiamina no medicamento de AMI, a razão foi igual, indicando que se a contaminação for realizada por este tipo de composto, o método não iria fazer uma análise qualitativa da TF. Uma alternativa para um teste qualitativo seria realizar um VC de uma amostra referência com o analito do medicamento antes das análises e compara-lo em relação às amostras. Outra opção para um teste qualitativo seria realizar a detecção com mais pulsos de potencial pela detecção MPA e plotar gráficos 3D das razões obtidas dos sinais analíticos, mas estes estudos de comparação não foram realizados neste trabalho.

#### **4.2.8 - Comparação do método proposto para a determinação de TF, CM, VF e VP com os métodos eletroanalíticos reportados na literatura.**

Nas tabelas 13, 14, 15 e 16, são apresentados os dados dos métodos eletroanalíticos reportados na literatura para a determinação da TF, CM, VF e VP, respectivamente, em relação ao método proposto, no que se refere às principais características da detecção eletroquímica e dos parâmetros analíticos obtidos por cada técnica.

**TABELA 13:** Comparação do método proposto com os métodos eletroquímicos reportados na literatura para a TF.

<b>Técnica**</b>	<b>Eletrodo de Trabalho*</b>	<b>Faixa linear (<math>\mu\text{mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>E<sub>det</sub></b>	<b>LD (<math>\mu\text{molL}^{-1}</math>)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Tipo de Amostra***</b>	<b>Referência</b>
VPD	P.C	-	0,6-1,0V	-	-	Flu	(MUNSON e ABDINE, 1978) <i>et al.</i> , 1977
AMP	E. NMP. TNQ	-	0,1V	-	-	Form. farm	(MCNEIL, COOPER e SPOORS, 1992)
VPD	Hg. G	0,0033-0019	-0,15V	0,0033	-	Form. farm	(SHUBIETAH, ABUZUHRI e Fogg, 1994)
VPD	P.C.M.Co	0,400-100	1,02V	0,1400	3,5(n=10)	Form. farm	(YANG <i>et al.</i> , 2004)
VC	N.T.C. Pt.N	0,010-10,0	1,10V	0,0080	1,8	Form. farm	(LIU <i>et al.</i> , 2011)
VPD	P.C. C <sub>19</sub> H <sub>42</sub> BrN	0,800-100	1,2V	0,1900	-	Form. farm/ Flu	(HEGDE, HOSAMANI e NANDIBEWOOR, 2009)
VPD	C.V.A.Cis	2,50-68,0	0,6-1,6V	0,1200	-	Form. farm	(BRUNETTI e DESIMONI, 2009)
VC	N.T.C	0,080-10,0	1,0V	0,0160	-	Form. farm	(SUN e HU, 2013)
VPD	N.T.C.Naf.C.V	0,080-60,0	1,2V	0,0200	2,4(n=5)	Form. farm	(YANG <i>et al.</i> , 2010)
VPD	C.V. G/Naf	0,010-1,00	1,3V	0,0060	-	Form. farm	(LI <i>et al.</i> , 2012)
VC	C.V. G	0,800-60,0	1,18V	0,1000	3,2	Chá	(CUI e ZHANG, 2013)



VPD/SWV	DDB	2,00-380	1,63V	0,9100 1,5000	-	Form.farm/ Urina	(CINKOVA <i>et al.</i> , 2015)
VPD	N.T.C. MnO <sub>2</sub>	0,100-200	1,1V	0,0100	3,8(n=10)	Form. Farm	(YANG e LI, 2015)
SWV	Naf/RuO <sub>2</sub>	100-1,00x10 <sup>5</sup>	1,17V	0,1000	1,38(n=15)	Form. Farm/Chá	(ZEN, YU e SHIH, 1999)
VPD	C.V.AHNSA	1,00-100	1,22	0,0470	-	Form. Farm	(AMARE e ADMASSIE, 2012)
VPD	C.V.CdSe	40,0-400	1,07	0,4000	4,14	Chá	(YIN <i>et al.</i> , 2012)
VPD	Au.L-Cy.Naf.G	0,004-60,0	1,3V	0,0004	2,21(n=5)	Form. Farm	(ZI <i>et al.</i> , 2012)
VPD	C.GMP. Naf	0,800-180	1,42V	0,3700	4,8(n=10)	Soro sanguíneo	(GAO, WANG e GUO, 2013)
VPD	G.AuAIQ	0,025-2,10	1,4V	0,0013	4,47(n=5)	Form.farm/Urina	(YANG, ZHAO e ZENG, 2014)
VPD	C.V.AT-Au	0,04-100	1,1V	0,0085	-	Soro sanguíneo/ Urina	(KESAVAN e JOHN, 2014)
VPD	Np.C SG	0,05-30	1,04V	0,0014	5,2	Form.farm	(GUNEY e CEBECI, 2015)
VPD	DDB	1,0-400	0,8-1,6V	0,0060	-	Form.farm	(SPATARU <i>et al.</i> , 2002)
BIA-MPA	DDB	0,100- 1000	1,5V	0,0086	2,18(n 10)	Form.farm	Método proposto

, \*P.C-pasta de carbono, E.NMP. TCNQ-enzimaticofenazinametossulfato, tetracianoquinodimetano, Hg. G- mercúrio gotejante, P.C.Co- pasta de carbono modificado com Cobalto, N.T.C. Pt.N- nanotubo de carbono com nanopartículas de Platina, P.C. C<sub>19</sub>H<sub>42</sub>BrN-pasta de carbono modificado com brometo de cetiltrimetilamônio, C.V.A.Cis-carbono vítreo modificado com ácido cisteico, N.T.C-nanotubo de carbono, N.T.C.Naf.C.V – nanotubos de carbono com paredes de nafion modificado com carbono vítreo, C.V. G/Naf- carbono vítreo modificado com grafeno/nafion , C.V.G- carbono vítreo modificado com grafeno, M.PPT- membrana de 2,6-bis (fenil) -4 (fenil) 3H-tiopiran, N.T.C. MnO<sub>2</sub>- nanotubo de carbono com nanopartículas de MnO<sub>2</sub>, Naf/RuO<sub>2</sub>- nafion modificado com RuO<sub>2</sub>, C.V.AHNSA- carbono vítreo modificado com 4-amino-3-

hidroxinaftaleno ácido sulfônico, Au.L-Cy.Naf.G-ouro modificado com L-cisteína/nafion/grafeno, C.GMP. Naf-carbono mesoporoso modificado com nafion, G.AuAIQ-grafeno modificado com nanopartículas de ouro com anisotrópica -quitosana iônica, C.V.AT-Au-carbono vítreo modificado com nanopartículas de Au, Np.C SG-nanopartículas de carbono modificado com filme de sol-gel. \*\*AMP–Amperometria, V.P.D- voltametria de pulso diferencial, V. O. Q- voltametria de onda quadrada, \*\*\* Flu- Fluido Biológico, Ali- Alimentos, Form. Farm- formulações farmacêuticas.

**TABELA 14:** Comparação do método proposto com os métodos eletroquímicos reportados na literatura para a CM.

Técnica**	Eletrodo de Trabalho*	Faixa linear ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	$E_{\text{det}}$	LD ( $\mu\text{molL}^{-1}$ )	DPR (%)	Tipo de Amostra***	Referência
VPD /VOQ	P.E	0,202-1,01/0,211-1,91	0,85V	0,0768 /0,213	-	Urina	(HABIB, RIZK e EL-ARYAN, 2011)
VPD	MIP/sol–gel/MWNT/Au	0,500-80,0	0,17V	0,024	8	Urina	(ZHANG <i>et al.</i> , 2010)
FIA-VC	UMEsAu	$9,4 \times 10^{-6}$ -100	0,3V	$3,1 \times 10^{-6}$	3,8(n=3)	Form.Farm	(NOROUZI <i>et al.</i> , 2008)
BIA-MPA	DDB	10,0-1000	1,6V	0,77	2,7(n=10)	Form.Farm	Método proposto

\*MIP/sol–gel/MWNT/Au – Eletrodo de nanopartículas Ouro modificado com MIP/sol- gel, UMEsAu – Microeletrodo de Ouro,\*\* FIA-VC flowinjectionanalysis acoplado a voltametria cíclica, V.P.D- voltametria de pulso diferencial, V. O. Q- voltametria de onda quadrada,\*\*\* Form.Farm- formulações farmacêuticas

**TABELA 15:** Comparação do método proposto com os métodos eletroquímicos reportados na literatura para a VF.

<b>Técnica**</b>	<b>Eletrodo de Trabalho*</b>	<b>Faixa linear (<math>\mu\text{molL}^{-1}</math>)</b>	<b>E<sub>det</sub></b>	<b>LD (<math>\mu\text{molL}^{-1}</math>)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Tipo de Amostra***</b>	<b>Referência</b>
VOQ	MWCNT	0,0001-1,90	1,8V	$7,7 \times 10^{-5}$	3,8	Sangue	(REZAEI, RAHMANIAN e ENSAFI, 2014)
VOQRA	PC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,500-1000	0,9V	0,21	2,3(n=5)	Form.Farm/ Sangue/Urina	(GHOLIVAND, TORKASHVAND e YAVARI, 2015)
VOQRC	Hg.G	0,005-0,400	-0,7V	$6,5 \times 10^{-4}$	-	Sangue/Urina	(GHONEIM e TAWFIK, 2004)
AMP	CV	-	1,05V	0,015	0,4	Form.Farm	(BELAL e ANDERSON, 1985)
BIA-MPA	DDB	8,00-800	1,2V	0,24	1,0(n=10)	Form.Farm	Método proposto

\*MWCNT - Eletrodo de paredes múltiplas de nanotubos de carbono, PC/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>- Pasta de carbono modificado com oxido de ferro,Hg.G- Gota pendente de Mercurio,CV – Carbonto vítreo, \*\*AMP – Amperometria, V.P.D- voltametria de pulso diferencial, V. O. Q- voltametria de onda quadrada,VOQRA- voltametria de onda quadrada com redissoluçãoanódica, VOQRC- voltametria de onda quadrada com redissolução catódica,\*\*\* Form.Farm- formulações farmacêuticas

**TABELA 16:** Comparação do método proposto com os métodos eletroquímicos reportados na literatura para o VP.

<b>Técnica**</b>	<b>Eletrodo de Trabalho*</b>	<b>Faixa linear (<math>\mu\text{molL}^{-1}</math>)</b>	<b><math>E_{\text{det}}</math></b>	<b>LD (<math>\mu\text{molL}^{-1}</math>)</b>	<b>DPR (%)</b>	<b>Tipo de Amostra***</b>	<b>Referência</b>
VPD/VC	C.V.N.T.C	2,50-70,0	0,93V	2,00 /1,60	3,92	Form. Farm/Sangue	(CHAMJANGALI <i>et al.</i> , 2015)
VOQRA/ VPDRA	C.V.N.T.C /P.CA	0,005-0,110 /0,070-1,00	1,09V	0,0036 /0,026	4,8(n=10)	Form. farm	(OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2013)
VPD/ VOQ	P.CFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub> MCM-41	0,050-0,160 /0,160-0,350	0,71V	0,041	3,0	Sangue	(HASANZADEH <i>et al.</i> , 2013)
V.C	M.C.N.Au	0,0021-210	0,1V	0,0021	-	Sangue	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
VOQRC	G.PHg	0,010-1,00	-1,83V	0,0005	1,8	Form. Farm/Urina	(KASIM <i>et al.</i> , 2002)
BIA-MPA	DDB	1,00- 100	1,6V	0,075	2,79(n=10)	Form. Farm	Método proposto

\*C.V.N.T.C/P.CA-eletrodo de carbono vítreo modificado com natotubos de carbono e polímero de cloridrato de alilamina, P.CFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>MCM-41-eletrodo de pasta de carbono com substância magnética e matéria cristalino móvel – 41, M.C.N.Au-eletrodo de microchip com um conjunto de nanoeletrodos de Au, G.PHg-eletrodo de gota pendente de Hg, \*\* V.O.Q.R.A-voltametria de onda quadrada com redissoluçãoanódica, V.O.Q.R.C-voltametria de onda quadrada com redissolução catódica, V.P.D.R.A-voltametria de pulso diferencial com redissoluçãoanódica. \*\*\*Form.Farm- formulações farmacêuticas.

O presente método obteve em alguns casos uma faixa linear menor e uma maior LD em relação aos trabalhos anteriormente publicados na literatura para fármacos investigados. Em relação à estabilidade dos eletrodos de trabalho usados na literatura, podemos verificar pelas Tabelas anteriores que o método proposto, em geral, obteve melhores resultados de DPR, além da simplicidade do uso do eletrodo de DDB frente aos eletrodos modificados. No entanto, o grande destaque deste trabalho está na simplicidade de aplicação do método frente aos demais relatados para aplicações em amostras de formulações farmacêuticas, podendo realizar uma análise com alta frequência analítica teórica de 136, 53, 71 e 76 determinações por  $h^{-1}$  para TF, CM, VF e VP, respectivamente. Assim, o método proposto torna a técnica BIA-MPA com eletrodo de DDB uma alternativa mais atrativa para análises de rotina nas indústrias farmacêuticas e laboratórios de controle de qualidade da TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas.

#### **4.3 CAPÍTULO – 2 Estudo da viabilidade de substituição no sistema de injeção no sistema BIA da micropipeta automática por uma seringa descartável.**

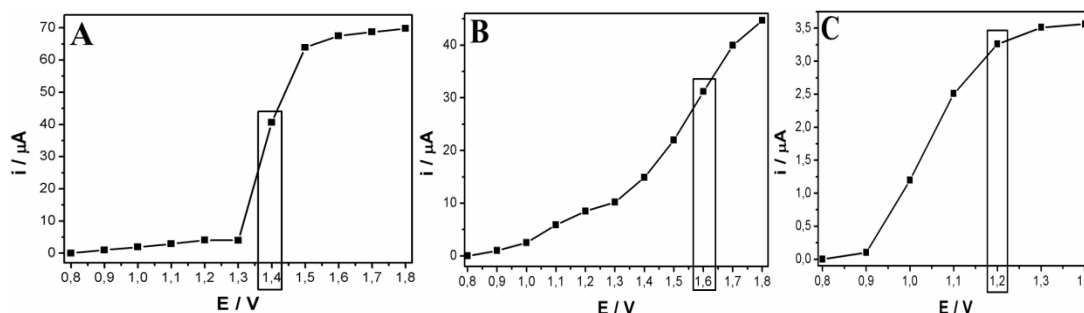
Este estudo pretende comprovar a possibilidade da substituição da injeção da micropipeta automática por uma seringa descartável, diminuindo assim o custo do método proposto. Os testes foram realizados para os fármacos TF, CM e VF nos mesmos eletrólitos de suporte estabelecidos anteriormente, porém devido à mudança na injeção do sistema BIA, os pulsos de potencial para detecção dos compostos foram reavaliados.

Este estudo optou-se por realizar a pesquisa com fármacos que apresenta somente o sinal de oxidação, como o VP apresenta o sinal de redução e este é dependente do sinal de oxidação é necessário que se tenha uma injeção mais lenta para proporcionar a geração de maior quantidade de produto de oxidação para obter um maior sinal de redução. Com o uso da seringa descartável a injeção com a velocidade mais lenta não é possível obter resultados satisfatório.

##### **4.3.1 – Determinação dos pulsos de potenciais de detecção e o tempo de aplicação de cada potencial.**

Os pulsos de potencial para detecção dos fármacos foram otimizados novamente com a injeção pela seringa descartável (Figura 18). O tempo de duração dos pulsos de potencial de detecção de cada fármaco foi fixado em 50 ms para todos os casos estudados. Na Figura 17 é possível notar o potencial de detecção (oxidação) da TF, CM e VF.

**FIGURA 17:** Voltamograma hidrodinâmico obtido por BIA-MPA sob eletrodo de BDD dos fármacos em (A) TF em meio de  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $0,1\text{mol L}^{-1}$ , (B) CM em meio de tampão fosfato (pH=7,0)  $0,1\text{mol L}^{-1}$  e em (C) VF em meio de tampão fosfato (pH=7,0)  $0,1\text{mol L}^{-1}$  com 10% de álcool etílico. A concentração dos fármacos de  $1 \times 10^{-3}\text{mol L}^{-1}$  em todos os casos. Injeções realizadas com a SD.



Pela Figura 17, pode ser identificado que para o fármaco TF ocorreu uma pequena mudança do potencial de detecção por apresentar um corrente apreciável mais apreciável apenas em +1,4 V, diferente do estudo com a micropipeta que já tinha essa corrente em +1,1 V. Todavia, para a CM e VF as magnitudes de corrente foram mantidas em função do potencial de detecção aplicado e por isso os mesmos valores do pulso de potencial foram mantidos em +1,6V e +1,2 V, respectivamente. Além disso, o potencial de limpeza e tempo de aplicação de todos os pulsos de potenciais foram os mesmos, com exceção do tempo de aplicação do potencial de detecção (50ms) para todos os fármacos.

#### 4.3.2 – Determinação do volume de injeção e das velocidades de injeção e agitação.

Os estudos de velocidade e volume de injeção não foram realizados como no procedimento das análises anteriores, uma vez que, o volume de injeção da seringa tem um valor total 300  $\mu\text{L}$ , e considera-se que esse volume é o mais confiável para ser mensurado, e nesse sentido, o mesmo não foi variado durante todas as análises.

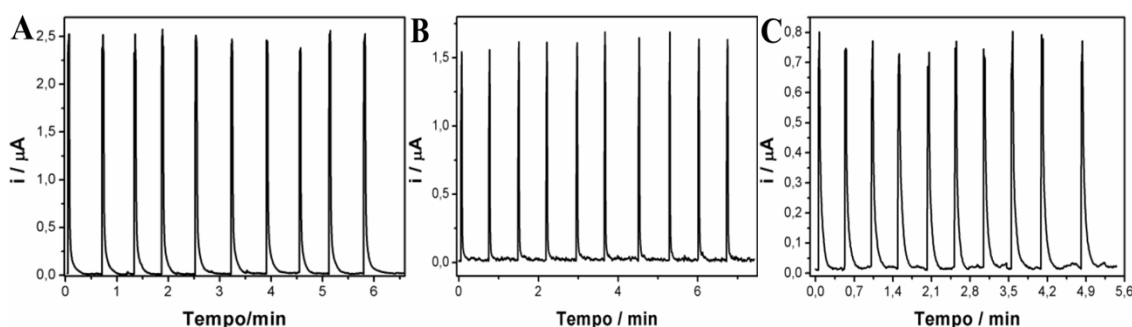
A velocidade de injeção dependerá inteiramente da habilidade do operador para que consiga manter uma velocidade que não varie o fluxo da injeção do começo ao fim, uma vez que, caso isto aconteça ocorrerá erros na análise. A velocidade alcançada para os estudos com a seringa foi de aproximadamente  $107\mu\text{Ls}^{-1}$ , a qual no caso tem uma diferença 7% para a otimizada pela micropipeta em relação aos fármacos TF, CM e VF.

Para a velocidade de agitação, foi utilizado o mesmo parâmetro adotado nas análises anteriores, ou seja, a velocidade que apresentou menor tempo de retorno do sinal analítico para “linha de base” foi selecionada (em torno de 4,5V do motor de agitação).

### 4.3.3 – Ensaios de Repetibilidade e determinação da faixa linear de trabalho.

O estudo de repetibilidade foi realizado seguindo os mesmos parâmetros usados com a micropipeta automática. Na Figura 18 são apresentadas as 10 medidas sequenciais de injeções de soluções padrão a  $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  de cada fármaco.

**FIGURA 18:** Amperograma obtido por BIA-MPA com injeção por uma seringa sob o eletrodo de BDD para 10 soluções padrão de (A) TF com potencial de oxidação 1,4V/50 ms e limpeza 1,7V/100ms, (B) CM potencial de oxidação 1,6V/50ms e limpeza 0,5V/100ms e (C) VF potencial de oxidação 1,2V/50ms e limpeza -0,2V/100ms



A Tabela 17 mostra os DPRs obtidos pela detecção BIA-MPA com a injeção pela micropipeta automática e com a seringa descartável. De forma comparativa entre os DPRs dos modos de injeção, podemos observar que para TF e CM os DPRs foram muito próximos e apenas para VF a injeção manual pela seringa foi superior em relação ao modo automático. De qualquer forma, os DPRs dos fármacos obtidos pela injeção manual foram todos menores que 5%, ou seja, dentro do permitido para validação de uma metodologia para controle de qualidade de fármacos.

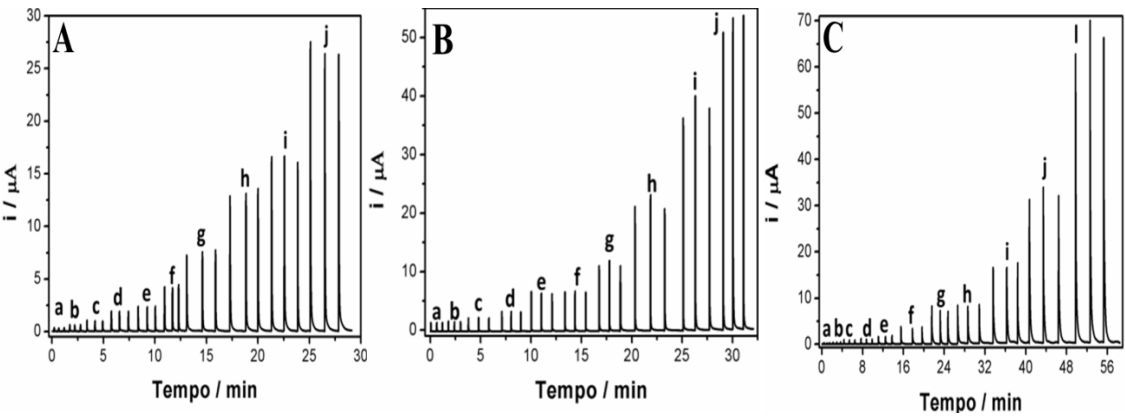
Para a obtenção de resultados similares utilizando a seringa, o operador necessita de treinamento prévio, uma vez que a velocidade de injeção interfere diretamente nos resultados. Nesse processo, tanto a rapidez quanto a lentidão da injeção interferirá na leitura dos dados pelo sistema, ora pelo gotejamento, ora pelos ruídos gerados devido velocidade rápida. A pressão contínua e moderada no êmbolo da seringa proporciona um jato uniforme, ou seja, obtém-se a mesma velocidade do início ao fim da injeção. O monitoramento do tempo de cada injeção contribui na identificação da velocidade ideal para a realização das análises, onde a regularidade do tempo obtido em cada injeção evidenciará que a velocidade está sendo mantida.

**TABELA 17:** DPRs obtidos pela detecção BIA-MPA para injeção sequencial de 10 soluções padrão de cada Fármaco ( $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) com a micropipeta automática (MA) e com seringa descartável (SD).

Modo de Injeção	Fármacos		
	TF	CM	VF
MA (DPR)	2,18	2,70	1,00
SD (DPR)	2,40	2,90	3,00

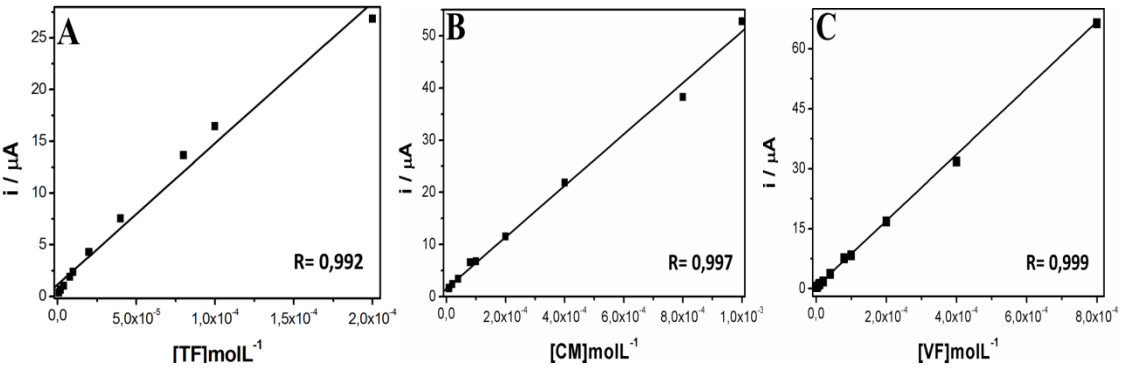
O estudo da faixa linear de trabalho foi realizado semelhante ao da micropipeta automática. As faixas lineares estudada foram para: a TF ( $1,0 \times 10^{-6}$  a  $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), a CM ( $8,0 \times 10^{-6}$  a  $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ ) e a VF ( $2,0 \times 10^{-6}$  a  $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ). Na Figura 19 são apresentados os BIAgramas das respectivas faixas de cada fármaco.

**FIGURA 19:** BIAgrama das faixas lineares em (A) TF de (a)= $1,0 \times 10^{-6}$  a (j)= $2,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , (B) CM de (a)= $8,0 \times 10^{-6}$  a (j)= $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , (C) VF de(a)=  $2,0 \times 10^{-6}$  a (l)= $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ . Usando a SI.



Através deste estudo foi possível identificar a curva de regressão linear destes fármacos com as respectivas equações mostradas na Figura 20.

**FIGURA 20:** Curvas de regressão linear provenientes dos estudos dos resultados obtidos pelo BIAgrama da Figura 20 para cada fármaco. O coeficiente de correlação linear para cada curva está inserido nos gráficos.



Abaixo as equações da regressão linear dos fármacos TF, CM e VF.

$i(A) = 1,115 \times 10^{-6} (\pm 4,350 \times 10^{-7}) + 0,136 (\pm 5,692 \times 10^{-3}) A \text{ mol}^{-1} L^{-1}(1)$  para TF



$$i(A) = 1,156 \times 10^{-6} (\pm 5,100 \times 10^{-7}) + 0,049 (\pm 1,183 \times 10^{-3}) A \text{ mol}^{-1} \text{L}^{-1} (2) \text{ para CM}$$

$$i(A) = 2,380 \times 10^{-7} (\pm 1,910 \times 10^{-7}) + 0,081 (\pm 7,106 \times 10^{-3}) A \text{ mol}^{-1} \text{L}^{-1} (3) \text{ para VF}$$

Na tabela 18, podem ser comparadas as faixas lineares de trabalho, a sensibilidade (B), os coeficientes de correlação linear (R) e os limites de detecção (LDs) obtidos pela micropipeta automática (MA) e seringa descartável (SD) para cada fármaco. Quando comparados com valores obtidos com a MA, é possível notar que as análises com a SD para os fármacos CM e VF apresentaram (B) e LD menores e a faixa linear de trabalho começou em concentração mais baixa. No entanto, com o uso da SD para a TF, o LD foi maior e a faixa linear de trabalho foi reduzida. O R, para a VF tanto com a MA quanto com a SD apresentou resultados idênticos. Entretanto com a TF e a CM, a SD apresentou resultados menores. Os resultados obtidos pela injeção manual atende aos parâmetros de faixa linear (mínimo de 5 pontos) e do R (mínimo de 0,99) recomendados pela ANVISA para este tipo de análise.

**TABELA 18:** Comparação do coeficiente angular da curva (B), R, LD, LQ e a faixa linear de trabalho (FLT) obtidos com a MA com os da SD dos fármacos TF, CM e VF.

MA/SD	FLT ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	R	LD ( $\mu\text{mol L}^{-1}$ )	Sensibilidade ( $\mu\text{A}/\mu\text{mol}$ )
TF	0,1-1000	0,999	0,0086	$2,680 \times 10^5$
CM	10-1000	0,998	0,7777	$2,540 \times 10^5$
VF	8-800	0,999	0,2448	$1,220 \times 10^5$
TF	1-200	0,992	0,042	$1,361 \times 10^5$
CM	8-1000	0,997	0,0522	$4,929 \times 10^4$
VF	2-800	0,999	0,0691	$8,193 \times 10^4$

#### 4.3.4 - Ensaio de adição e recuperação em amostras farmacêuticas.

Os dados de adição e recuperação foram realizados com as mesmas amostras utilizadas no estudo com a micropipeta automática. A maneira de calcular a recuperação foi mantida para a TF e CM e para VF mudou a maneira de calcular optando por usar o calculo com a diferença entre as concentrações ( $R\% = \frac{[Am+P]-[Am]}{[TP]} \times 100$ ). Todos os fármacos apresentaram recuperação próxima a 100% como mostrado na Tabela 19 e com a micropipeta automática anteriormente (Tabela 9). Além disso, os resultados com injeção manual estão dentro do limite permitido para validação do método pela ANVISA ( $\pm 5\%$ ).

**TABELA 19:** Resultados da adição e recuperação dos fármacos TF, CM e VF.

Medicamentos (princípio ativo)	Rotulado (mg)	Adição (mg)	Encontrado (mg)	Recuperação (%)
TF	100	5,40	5,35	98,90±3,12
CM	300	12,75	12,49	97,90±1,13
VF	5	13,21	12,60	95,40±2,42

#### 4.3.5 - Comparação da metodologia proposta para a determinação de TF, CM e VF em formulações farmacêuticas com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira.

Para finalizar a validação dos métodos para determinação da TF, CM, e VF por BIA-MPA utilizando uma seringa descartável para injeção no sistema, realizamos a comparação do método proposto com os métodos oficiais preconizados pela Farmacopeia Brasileira, conforme apresentado na Tabela 20.

**TABELA 20:** Resultados da comparação da metodologia proposta para a determinação de TF, CM e VF em formulações farmacêuticas com a metodologia oficial. Os valores após o  $\pm$  são os desvio padrão da análise em triplicata de cada amostra.

Medicamentos (princípio ativo)	Rotulado (mg)	BIA-MPA (mg)	Método Oficial (mg)
TF	100	94,3±3,8	90,9±0,2
CM	300	342,4±1,5	344,8±0,9
VF	5,0	5,01±0,07	5,3±0,09

Como realizado no estudo com a micropipeta automática os testes  $F$  e  $t$  foram aplicados para comprovação da semelhança em média pelo teste  $t$  e em variância pelo teste  $F$  no intervalo de confiança de 95%. Os resultados são apresentados na Tabela 21.

**TABELA 21:** Resultados dos testes *F* e *t* da TF, CM e VF.

<b>Analito</b>	<b>Teste <i>F</i></b>		<b>Teste <i>t</i></b>		<b>Parecer Estatístico</b>
	<b>Valor Calculado</b>	<b>Valor Critico</b>	<b>Valor Calculado</b>	<b>Valor Critico</b>	
TF	361,0	19,0	1,87	2,78	Não Semelhante
CM	2,77	19,0	0,01	2,78	Semelhante
VF	1,65	19,0	5,09	2,78	Não semelhante

De acordo com a Tabela 21 o método proposto apresentou semelhança com o método oficial somente para a CM e VF no que tange a precisão pelo teste *F*, porém apenas para a VF não foi obtido um resultado semelhante de exatidão pelo teste *t*. Como o método oficial para TF é o mesmo para VF (espectrofotometria com absorção no ultravioleta) e no caso da TF o teste *t* foi satisfatório, mas no teste *F* a VF apresentou resultado satisfatório. Tais resultados podem ser comprovados pela comparação das médias e dos desvios padrão do método proposto com o método oficial. No caso da VF a média obtida no método proposto tem valor menor que a do método oficial, sendo determinante para a não semelhança entre os métodos pelo teste *t* e para a TF o desvio padrão do método proposto tem valor maior que o desvio do método oficial fator categórico para a não semelhança entre os métodos no teste *F*, provavelmente, ocorreu algum erro experimental neste procedimento na determinação da VF pelo método proposto com a injeção manual do sistema BIA. Vale lembrar que, pelo método proposto com a injeção automática a VF foi devidamente validada. Deste modo, esses resultados indicam que a utilização da seringa descartável para injeção no sistema BIA pode ser uma alternativa para uma aplicação de baixo custo em farmácias de manipulação.

## 5 – CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O método proposto por BIA-MPA usando o eletrodo de DDB mostrou-se eficiente, rápido e simples para determinação da TF, CM, VF e VP em formulações farmacêuticas. Todos os métodos foram devidamente validados, podendo estes ser usados pelas indústrias farmacêuticas oferecendo vantagens em relação aos métodos oficiais, como por exemplo, menor geração de resíduos e alta frequência analítica (>53 determinações por hora) obtida pelo sistema BIA, principalmente, quando comparado aos métodos cromatográficos, além dos

menores tempos de preparo e tratamento das amostras, que são características da detecção eletroquímica.

O presente método mostrou-se ainda mais simples e rápido que os demais relatados por eletroanalítica para detecção desses compostos, principalmente, pelo uso do sistema BIA. Aliado a este sistema de fluxo, este trabalho propôs o uso de um eletrodo de DDB que é mais simples (sem modificações tediosas) em relação aos demais reportados na literatura. Além disso, o eletrodo de DDB, em geral, apresentou ser mais inerte a passivação e contaminação da sua superfície, aumentando a reprodutibilidade do método de análise destes compostos. Cabe ressaltar que, pela primeira vez, o eletrodo de BDD foi aplicado para detecção da CM, VF e VP. Outro fator inédito para determinação de todos esses compostos está na detecção eletroquímica realizada por MPA, a qual aliada ao eletrodo de DDB proporcionou um baixo DPR nas análises para TF, CM, VF e VP pela aplicação de pulsos de potencial de limpeza.

Além das vantagens supracitadas pelo método proposto, o controle de qualidade dos fármacos investigados, TF, CM, VF e VP podem ser realizados com custo muito menor tanto na aquisição e manutenção dos equipamentos utilizados pelos métodos oficiais, quanto na aplicação das análises destes compostos. Essa vantagem pode ser atrativa para indústrias farmacêuticas que realizam análises de rotina destes compostos, bem como pode viabilizar o controle de qualidade destes medicamentos nas farmácias de manipulação.

Este trabalho mostrou ainda a possibilidade de substituir a injeção automática no sistema BIA por uma injeção manual realizada por uma seringa descartável. Os resultados indicaram que as análises realizadas pela injeção manual para determinação da TF e CM em formulações farmacêuticas foram semelhantes aos obtidos pela injeção automática, sendo estes devidamente validados. Dessa forma, controle de qualidade destes medicamentos pelo método BIA-MPA pode ter um custo muito menor utilizando a seringa descartável para injeção, tornando-o ainda mais acessível às farmácias de manipulação.

Como perspectivas, o presente trabalho abre a possibilidade para investigação dos outros fármacos de baixo índice terapêuticos pelo método BIA-MPA usando o eletrodo de DDB ou outro ainda mais simples, como os eletrodos impressos. O sucesso na aplicação de um método simples, rápido e de baixo custo para os 22 medicamentos, ou da maior parte destes, que compreendem a classe dos fármacos de baixo índice terapêuticos pode inserir de fato as técnicas eletroanalítica na área de controle de qualidade de produtos farmacêuticos.

Outra perspectiva deste método seria sua aplicação para outros fármacos eletroativos de produção em grande escala na indústria farmacêutica.

## 6 – REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

AMARE, M.; ADMASSIE, S. differential pulse voltammetric determination of theophylline at poly(4-amino-3-hydroxynaphthalene sulfonic acid) modified glassy carbon electrode. **Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia**, v. 26, n. 1, p. 73-84, 2012 2012. ISSN 1011-3924.

(ANVISA), A. N. D. V. S. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 67, 8 de Outubro de 2007** 2007.

(ANVISA), A. N. D. V. S. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 89, 9 de Maio de 2003** 2003.

ANVISA. **Farmacopeia Brasileira**. 2 2010.

ARRUABARRENA, J.; COELLO, J.; MASPOCH, S. NIR reflectance determination of warfarin in a solid preparation commercialized at different API mass proportions. **Analytical Methods**, v. 5, n. 16, p. 3858-3863, 2013 2013. ISSN 1759-9660.

ARRUABARRENA, J.; COELLO, J.; MASPOCH, S. Raman spectroscopy as a complementary tool to assess the content uniformity of dosage units in break-scored warfarin tablets. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465, n. 1-2, p. 299-305, Apr 25 2014. ISSN 0378-5173.

ASAFU-ADJAYE, E. B.; SHIU, G. L. Solid-phase extraction-high-performance liquid chromatography determination of verapamil and norverapamil enantiomers in urine. **Journal of Chromatography B**, v. 707, n. 1-2, p. 161-167, Apr 10 1998. ISSN 0378-4347.

BATZIAS, G. C.; DELIS, G. A.; KOUTSOVITI-PAPADOPOULOU, M. A new HPLC/UV method for the determination of clindamycin in dog blood serum. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 35, n. 3, p. 545-554, May 28 2004. ISSN 0731-7085.

BELAL, F.; ANDERSON, J. L. Flow-injection analysis of warfarin sodium with amperometric detection. **Mikrochimica Acta**, v. 2, n. 3-4, p. 145-151, 1985 1985. ISSN 0026-3672.

BO, Z. G.; LU, X. S. Poly(vinyl chloride) membrane-electrode for the determination of verapamil. **Analytica Chimica Acta**, v. 235, n. 2, p. 461-464, Aug 15 1990. ISSN 0003-2670.

BONFILIO, R.; EMERICK, G. L.; JUNIOR, A. N.; SALGADO, H.R. Farmácia Magistral: Sua importância e seu perfil de qualidade. **Revista Baiana de Saúde Pública**, v. 34, n. 3, 2010.

BORGES, N. C. D.; MENDES, G.D.; BARRIENTOS-ASTIGARRAGA, R. E.; GALVINAS, P. Verapamil quantification in human plasma by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry - An application for bioequivalence study. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 827, n. 2, p. 165-172, Dec 5 2005. ISSN 1570-0232.

BRUNETTI, B.; DESIMONI, E. Determination of Theophylline at a Cysteic Acid Modified Glassy Carbon Electrode. **Electroanalysis**, v. 21, n. 6, p. 772-778, Mar 2009. ISSN 1040-0397.

CECCATO, A.; CHIAP, P.; HUBERT, P. H.; TOUSSAINT, B.; CROMMEN, B. Automated determination of verapamil and norverapamil in human plasma with on-line coupling of dialysis to high-performance liquid chromatography and fluorometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 750, n. 1-2, p. 351-360, Oct 25 1996. ISSN 0021-9673.

CHAILAPAKUL, O.; SIANGPROH, W.; TRYK, D. A. Boron-doped diamond-based sensors: A review. **Sensor Letters**, v. 4, n. 2, p. 99-119, Jun 2006. ISSN 1546-198X.

CHAMJANGALI, M. A.; GOUDARZI, N.; BAGHERIAN, G.; RESKETGI, A. A. Development of a new electrochemical sensor for verapamil based on multi-walled carbon nanotube immobilized on glassy carbon electrode. **Measurement**, v. 71, p. 23-30, Jul 2015. ISSN 0263-2241.

CHEN, A.; TSÃO, M. J.; CHUANG, J.F.; LIN, C. H. Electrochemical determination of Verapamil with a microchip embedded with gold nanoelectrode ensemble electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 89, p. 700-707, Feb 1 2013. ISSN 0013-4686.

CHO, S. H.; IM, H. T.; PARK, W. S.; HA, Y. H.; CHOI, Y. W.; LEE, K. T. Simple method for the assay of clindamycin in human plasma by reversed-phase high-performance liquid chromatography with UV detector. **Biomedical Chromatography**, v. 19, n. 10, p. 783-787, Dec 2005. ISSN 0269-3879.

CINKOVA, K.; ZBOJEKOVÁ, N.; VOJS, M.; MARTON, M.; SAMPHÃO, A.; SVORC, L. Electroanalytical application of a boron-doped diamond electrode for sensitive voltammetric determination of theophylline in pharmaceutical dosages and human urine. **Analytical Methods**, v. 7, n. 16, p. 6755-6763, 2015. ISSN 1759-9660.

CUI, F.; ZHANG, X. A method based on electrodeposition of reduced graphene oxide on glassy carbon electrode for sensitive detection of theophylline. **Journal of Solid State Electrochemistry**, v. 17, n. 1, p. 167-173, Jan 2013. ISSN 1432-8488.

DA SILVA, L. L. G.; CORAT, E. J.; TRAVA-AIROLDI, V. J.; LEITE, N. F.; IHA, K.; DE BARROS, R. C. M. Crescimento do Diamante dopado com Boro para eletrodos de uso em Eletroquímica. **Materials Research**, v. 2, 1999.

DE ARMAS, G.; MIRÓ, M.; ESTRELA, J. M.; CERDÁ, V. Multisyringe flow injection spectrofluorimetric determination of warfarin at trace levels with on-line solid-phase preconcentration. **Analytica Chimica Acta**, v. 467, n. 1-2, p. 13-23, Sep 3 2002. ISSN 0003-2670.

DE BARROS, R. D. M.; DA SILVA, L. L. G.; CORAT, E. J.; TRAVA-AIROLDI, V. J.; LEITE, N. T.; ILHA, K. Boron-doped CVD diamond films. Part 1. History, production and characterization. **Quimica Nova**, v. 28, n. 2, p. 317-325, Mar-Apr 2005. ISSN 0100-4042.

DETHY, J. M.; DE BROUX, S.; LESNE, M.; LONGSTRETHY, J.; GILBERT, P. Stereoselective determination of verapamil and norverapamil by capillary electrophoresis.

**Journal of Chromatography B-Biomedical Applications**, v. 654, n. 1, p. 121-127, Mar 18 1994. ISSN 0378-4347.

DO SOCORRO M. Q, M. **Desenvolvimento de sensores eletroquímicos associados a batch injection analysis (bia) para aplicações analíticas**. 2003. pg.112 Instituto de Química, Universidade de São Paulo,

DOS SANTOS, W. T. P; LIMA, A. B. ; ALECRIN, M. F. ; GUEDES, T. J. ; MOREIRA, D. A. R. **Determinação da warfarina por amperometria pulsada em FIA usando eletrodo de diamante dopado com boro**. In: SBQ, 38 Reunião Anual da SBQ, 2015, Águas de Lindóia.

DOS SANTOS, W. T. P.; GIMENES, D. T.; RICHTER, E. M.; ANGNES, L. Flow injection analysis with multiple pulse amperometric detection: potentialities and applications. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1753-1761, 2011 2011. ISSN 0100-4042.

ELYAZBI, F. A.; BLAIH, S. M. Spectrophotometric and titrimetric determination of clindamycin hydrochloride in pharmaceutical preparations. **Analyst**, v. 118, n. 5, p. 577-579, May 1993. ISSN 0003-2654.

FARIDBOD, F.; GANJALI, M. R.; SAFARALIEE, L.; RIAHI, L.; HOSSEINI, M.; NOROUZI, P. Verapamil Potentiometric Membrane Sensor for Verapamil Pharmaceutical Analysis. Computational Investigation. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 4, n. 10, p. 1419-1435, Oct 2009. ISSN 1452-3981.

FARMÁCIA, C. F. D.; PAES, M. **Manipulação de remédio vem registrando expansão**. p. <<http://www.cff.org.br/noticia.php?id=1280>>, 2013. Acesso em: 15 de Jan 2016.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Fast and Accurate Analysis of Drugs Using Amperometry Associated With Flow Injection Analysis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 12, p. 4784-4804, Dec 2010. ISSN 0022-3549.

FIEGER-BUSCHGES, H.; SCHUBLER, G.; LARSIMONT, V.; BLUME, H. Determination of clindamycin in human plasma by high-performance liquid chromatography using coupled columns. **Journal of Chromatography B**, v. 724, n. 2, p. 281-286, Mar 19 1999. ISSN 0378-4347.

FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; KUBOTA, L. T. Self-assembled monolayers applications for the development of electrochemical sensors. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 381-389, May-Jun 2003. ISSN 0100-4042.

GAO, Y.; WANG, H.; GUO, L. Simultaneous determination of theophylline and caffeine by large mesoporous carbon/Nafion modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 706, p. 7-12, Oct 1 2013. ISSN 1572-6657.

GARCIA, M. A.; ARAMAYONA, J. J.; BREGANTE, M. A.; FRAILE, L. I. Simultaneous determination of verapamil and norverapamil in biological samples by high-performance liquid chromatography using ultraviolet detection. **Journal of Chromatography B**, v. 693, n. 2, p. 377-382, Jun 6 1997. ISSN 0378-4347.

GHAMBARI, H.; HADJMOHAMMADI, M. Low-density solvent-based dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography for determination of warfarin in human plasma. **Journal of Chromatography B-Analytical**

**Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 899, p. 66-71, Jun 15 2012. ISSN 1570-0232.

GHOLIVAND, M. B.; TORKASHVAND, M.; YAVARI, E. Electrooxidation behavior of warfarin in Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles modified carbon paste electrode and its determination in real samples. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 48, p. 235-242, Mar 1 2015. ISSN 0928-4931.

GHONEIM, M. M.; TAWFIK, A. Assay of anti-coagulant drug warfarin sodium in pharmaceutical formulation and human biological fluids by square-wave adsorptive cathodic stripping voltammetry. **Analytica Chimica Acta**, v. 511, n. 1, p. 63-69, May 24 2004. ISSN 0003-2670.

GIMENES, D. T. ; CUNHA R.R. ; SILVA, R. A. B. DA ; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. **Injeções reprodutíveis em sistema BIA usando seringas descartáveis: emprego do método do padrão interno.** 16 ENCONTRO NACIONAL DE QUÍMICA ANALÍTICA. ENQA, L. D. R. D. Campus do Jordão - SP 2011.

GIMENES, D. T.; MARRA, M. C.; FREITAS, J. M.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Simultaneous determination of captopril and hydrochlorothiazide on boron-doped diamond electrode by batch injection analysis with multiple pulse amperometric detection. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 212, p. 411-418, Jun 2015. ISSN 0925-4005.

GIMENES, D.T.; DOS SANTOS, W.T. P.; TOMIM, T.F.; MUNOZ, R. A. A.; RICHTER, E. M. Flow-Injection Amperometric Method for Indirect Determination of Dopamine in the Presence of a Large Excess of Ascorbic Acid. **Electroanalysis**, v. 22, n. 1, p. 74-78, Jan 2010. ISSN 1040-0397.

GOODMAN; GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. 2005.

GOSSER JR, D. K.; Cyclic voltammetry. Simulation and Analysis of reaction mechanism, VCH Publishers, Inc, New York, 1993.

GUEDES, T. J.; ALECRIN, M. F.; OLIVEIRA, F. M.; LIMA, A. B. ; BARBOSA, S. L.; DOS SANTOS W. T. P. Determination of Prazosin in Pharmaceutical Formulations by Flow Injection Analysis with Multiple-Pulse Amperometric Detection using Boro-Doped Diamond Electrode. **Jornal of Solid State Electrochemistry**, 2016.

GUNEY, S.; CEBECI, F. C. Selective electrochemical sensor for theophylline based on an electrode modified with imprinted sol-gel film immobilized on carbon nanoparticle layer. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 208, p. 307-314, Mar 1 2015. ISSN 0925-4005.

HABIB, I. H. I.; RIZK, M. S.; EL-ARYAN, T. R. Determination of clindamycin in dosage forms and biological samples by adsorption stripping voltammetry with carbon paste electrode. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 44, n. 12, p. 705-710, Mar 2011. ISSN 0091-150X.

HAMIDI, S.; JOUYBAN, A. Capillary electrophoresis with UV detection, on-line stacking and off-line dispersive liquid-liquid microextraction for determination of verapamil enantiomers in plasma. **Analytical Methods**, v. 7, n. 14, p. 5820-5829, 2015. ISSN 1759-9660.



HASANZADEH, M.; POURNAGHI-AZAR, M.H.; SHADJAU, N.; JOUYBAN, A. A verapamil electrochemical sensor based on magnetic mobile crystalline material-41 grafted by sulfonic acid. **Electrochimica Acta**, v. 89, p. 660-668, Feb 1 2013. ISSN 0013-4686.

HASSAN, S. S. M.; MAHMOUD, W. H.; ABDEL-SAMAD, M. S. Direct potentiometry and potentiometric titrimetry of warfarin and ibuprofen in pharmaceutical preparations using PVC ferroin-based membrane sensors. **Mikrochimica Acta**, v. 129, n. 3-4, p. 251-257, 1998 1998. ISSN 0026-3672.

HASSAN, S. S. M.; MAHMOUD, W. H.; ELMOSALLAM, M. A. F.; ALMARZOOQI, M. H. J. Iron(II)-phthalocyanine as a novel recognition sensor for selective potentiometric determination of diclofenac and warfarin drugs. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 1-2, p. 315-321, Sep 1 2005. ISSN 0731-7085.

HEGDE, R. N.; HOSAMANI, R. R.; NANDIBEWOOR, S. T. Electrochemical Oxidation and Determination of Theophylline at a Carbon Paste Electrode Using Cetyltrimethyl Ammonium Bromide as Enhancing Agent. **Analytical Letters**, v. 42, n. 16, p. 2665-2682, 2009 2009. ISSN 0003-2719.

HORNEDONUNEZ, A.; GETEK, T. A.; KORFMACHER, W. A. High-performance liquid-chromatography of clindamycin and clindamycin phosphate with electrochemical detection. **Journal of Chromatography**, v. 503, n. 1, p. 217-225, Mar 9 1990. ISSN 0021-9673.

HOU, J.; ZHENG, H.; SHAMSI, S. A. Separation and determination of warfarin enantiomers in human plasma using a novel polymeric surfactant for micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1159, n. 1-2, p. 208-216, Aug 3 2007.

HUBERT, P.; CHIOP, P.; CECCATO, A.; BECHET, J.; SIBENALER-DECHAMPS, R.; MAES, P.; CHOMMEN, J. Determination of verapamil and norverapamil in human plasma by liquid-chromatography - comparison between a liquid-liquid-extraction procedure and an automated liquid solid extraction method for sample preparation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 10, n. 10-12, p. 937-942, Oct-Dec 1992. ISSN 0731-7085.

HUPERT, M.; MUCK, A.; WANG, J.; STOTTER, J.; CVACKOVA, Z.; HAYMAOND, S.; SHOW, Y.; SWAIN, G. M. Conductive diamond thin-films in electrochemistry. **Diamond and Related Materials**, v. 12, n. 10-11, p. 1940-1949, Oct-Nov 2003. ISSN 0925-9635.

IVANOVA, V.; ZENDELOVSKA, D.; STEFORVA, M.; STAFILOV, V. T. HPLC method for determination of verapamil in human plasma after solid-phase extraction. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, n. 6, p. 1297-1303, Apr 24 2008. ISSN 0165-022X.

KANAKAL, M. M.; MAJID, A. S. A.; SATTAR, M. Z. A.; AJMI, N. S.; MAJID, A. M. S. A. Buffer-Free High Performance Liquid Chromatography Method for the Determination of Theophylline in Pharmaceutical Dosage Forms. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 1, p. 149-153, Jan 2014. ISSN 1596-5996.

KASIM, E. A.; GHANDOUR, M. A.; EL-HATY, M. T.; AHMED, M. M. Determination of verapamil by adsorptive stripping voltammetry in urine and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 30, n. 4, p. 921-929, Nov 7 2002. ISSN 0731-7085.

KESAVAN, S.; JOHN, S. A. Fabrication of aminotriazole grafted gold nanoparticles films on glassy carbon electrode and its application towards the simultaneous determination of theophylline and uric acid. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 205, p. 352-362, Dec 15 2014. ISSN 0925-4005.

KHALIL, S.; KELZIEH, A. Determination of verapamil in pharmaceutical formulations using atomic emission spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, n. 1-2, p. 123-131, Jan 1 2002. ISSN 0731-7085.

LANDIS, J. B.; GRANT, M. E.; NELSON, S. A. Determination of clindamycin in pharmaceuticals by high-performance liquid-chromatography using ion-pair formation. **Journal of Chromatography**, v. 202, n. 1, p. 99-106, 1980 1980. ISSN 0021-9673.

LI, L. J.; GÃO, W. Y.; CAI, Z.; HU, D. C.; LI, Y. Q.; LAI, Y. B. Electrochemiluminescence of Sodium Dodecyl Sulfate-Verapamil Hydrochloride- Ru(bpy)(3)(2+) System and Its Application. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 39, n. 7, p. 1033-1037, Jul 2011. ISSN 0253-3820.

LI, Y.; WU, S.; LUO, P.; SONG, G.; ZHANG, K.; YE, B. Electrochemical Behavior and Voltammetric Determination of Theophylline at a Glassy Carbon Electrode Modified with Graphene/Nafion. **Analytical Sciences**, v. 28, n. 5, p. 497-502, May 2012. ISSN 0910-6340.

LIU, C. M.; CHEN, Y. K.; YANG, T. H.; HSIEH, S. Y.; HUNG, M. H.; LIN, E. T. High-performance liquid chromatographic determination of clindamycin in human plasma or serum: application to the bioequivalency study of clindamycin phosphate injections. **Journal of Chromatography B**, v. 696, n. 2, p. 298-302, Aug 29 1997. ISSN 0378-4347.

LIU, L.; XIÃO, F.; LI, J.; WU, W.; ZHÃO, F.; ZENG, B. Platinum nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes - Ionic liquid composite film coated glassy carbon electrodes for sensitive determination of theophylline. **Electroanalysis**, v. 20, n. 11, p. 1194-1199, Jun 2008. ISSN 1040-0397.

LIU, P.; LIU, R.; GUAN, G.; JIANG, C.; WANG, S.; ZHANG, Z. Surface-enhanced Raman scattering sensor for theophylline determination by molecular imprinting on silver nanoparticles. **Analyst**, v. 136, n. 20, p. 4152-4158, 2011 2011. ISSN 0003-2654..

MARTINC, B.; GRABNAR, I.; ROSKAR, R. Simultaneous determination of gabapentin, pregabalin, vigabatrin, and topiramate in plasma by HPLC with fluorescence detection. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 962, p. 82-88, Jul 1 2014. ISSN 1570-0232.

MCNEIL, C. J.; COOPER, J. M.; SPOORS, J. A. Amperometric enzyme electrode for determination of theophylline in serum. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 7, n. 5, p. 375-380, 1992 1992. ISSN 0956-5663.

MIURA, M.; OKUYAMA, S.; KATO, S.; KAGAYA, H.; MURATA, A.; KAMATSUDA, A.; WAKUI, H.; SAWADA, K. Simultaneous Determination of Warfarin and 7-Hydroxywarfarin Enantiomers by High-Performance Liquid Chromatography With Ultraviolet Detection. **Therapeutic Drug Monitoring**, v. 33, n. 1, p. 108-114, Feb 2011. ISSN 0163-4356.

MUNSON, J. W.; ABDINE, H. Determination of theophylline in plasma by oxidation at stationary carbon-paste electrode. **Talanta**, v. 25, n. 4, p. 221-222, 1978 1978. ISSN 0039-9140.

NIGOVIC, B.; SIMUNIC, B. Voltammetric assay of azithromycin in pharmaceutical dosage forms. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, n. 1, p. 197-202, Apr 24 2003. ISSN 0731-7085.

NOROUZI, P.; SHIRVANI-ARANI, S.; DANESHGAR, P.; GANJATI, M. R. Sub-second adsorption for the fast sub-nanomolar monitoring of Clindamycin in its pure and pharmaceutical samples by fast Fourier transformation with the use of continuous cyclic voltammetry at an Au microelectrode in a flowing system. **Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems**, v. 28, n. 1, p. 87-93, Jan 2008. ISSN 0928-4931.

OLIVEIRA, G. G.; AZZI, D.; VICENTINI, F. C.; SARTORI, E. R.; FILHO, O. F. Voltammetric determination of verapamil and propranolol using a glassy carbon electrode modified with functionalized multiwalled carbon nanotubes within a poly (allylamine hydrochloride) film. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 708, p. 73-79, Nov 1 2013. ISSN 1572-6657.

PLATZER, D. J.; WHITE, B. A. Development and validation of a gradient HPLC method for the determination of clindamycin and related compounds in a novel tablet formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 1, p. 84-88, Apr 11 2006. ISSN 0731-7085.

PLESKOV, Y. V. Synthetic diamond, a new electrode material for electroanalysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 55, n. 11, p. 1045-1050, Nov 2000. ISSN 1061-9348.

PLESKOV, Y. V. Electrochemistry of diamond: A review. **Russian Journal of Electrochemistry**, v. 38, n. 12, p. 1275-1291, Dec 2002. ISSN 1023-1935.

QUINTINO, M. S. M.; ANGNES, L. Batch injection analysis: An almost unexplored powerful tool. **Electroanalysis**, v. 16, n. 7, p. 513-523, Apr 2004. ISSN 1040-0397.

RAHMAN, N.; AZMI, S. N. H. Spectrophotometric method for the determination of verapamil hydrochloride in pharmaceutical formulations using N-bromosuccinimide as oxidant. **Farmaco (Lausanne)**, v. 59, n. 7, p. 529-536, July 2004. ISSN 0014-827X.

RAJU, C. B. V. N.; PANDA, G.; RÃO, N.; ROCKEG, J. HPLC-UV assay method for clindamycin palmitate hydrochloride as drug substance and oral solution. **Analytical Letters**, v. 41, n. 11, p. 2033-2043, 2008 2008. ISSN 0003-2719.

RANG, H. M.; DALE, M. M.; RITTER, J., M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro, 2001.

REZAEI, B.; RAHMANIAN, O.; ENSAFI, A. A. An electrochemical sensor based on multiwall carbon nanotubes and molecular imprinting strategy for warfarin recognition and determination. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 196, p. 539-545, Jun 2014. ISSN 0925-4005.

- RIAH, S.; MOUSAVI, M. F.; BATHAIE, S. Z.; SHAMSIPUR, M. A novel potentiometric sensor for selective determination of theophylline: Theoretical and practical investigations. **Analytica Chimica Acta**, v. 548, n. 1-2, p. 192-198, Aug 29 2005. ISSN 0003-2670.
- SALAZAR-BANDA, G. R.; CARVALHO, A. E.; ANDRADE, L.S.; ROCHA-FILHO, R. C.; AVACA, L. A. On the activation and physical degradation of boron-doped diamond surfaces brought on by cathodic pretreatments. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 40, n. 10, p. 1817-1827, Oct 2010. ISSN 0021-891X.
- SHUBIETAH, R. M.; ABUZUHRI, A. Z.; FOGG, A. G. Adsorptive cathodic stripping voltammetric determination of theophylline at a hanging mercury drop electrode. **Analyst**, v. 119, n. 9, p. 1967-1970, Sep 1994. ISSN 0003-2654.
- SKOOG, D. A.; HOLLEY, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios da Análise Instrumental**. ed. 2002.
- SMIRNOVA, T. D.; NEVRYUEVA, N. V.; SHTYKOV, S. N.; KOCHUBEI, V. I.; ZHEMERICHKIN, D. A. Determination of warfarin by sensitized fluorescence using organized media. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 64, n. 11, p. 1114-1119, Nov 2009. ISSN 1061-9348.
- SPATARU, N.; SARADA, B. V.; TRYK, D.A. Anodic voltammetry of xanthine, theophylline, theobromine and caffeine at conductive diamond electrodes and its analytical application. **Electroanalysis**, v. 14, n. 11, p. 721-728, Jun 2002. ISSN 1040-0397.
- SULTANA, N.; ARAYNE, M. S.; WAHEED, A. Method Development of Verapamil in Presence of NSAIDs using RP-HPLC Technique. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 32, n. 7, p. 2274-2278, Jul 20 2011. ISSN 0253-2964.
- SUN, W.; HU, J. Voltammetric determination of theophylline in pharmaceutical formulations using aligned carbon nanotubes (ACNTs) film modified electrode. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 68, n. 8, p. 694-699, Aug 2013. ISSN 1061-9348.
- SURESH, A. R. B.; THIPPESWAMY, B.; VINOD, A. B.; RAMAKISHORE, E. G.; ANAND, S.; SENATHIL, D. Determination of Theophylline in rabbit plasma by triple quadrupole LC/MS. **Pharm Methods**, v. 2, 2011.
- TEHRANI, M. B.; VATAN, S. F.; SOURI, E. Derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of clindamycin phosphate and tretinoin in pharmaceutical dosage forms. **Daru-Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, Apr 10 2013. ISSN 1560-8115.
- TORMIN, T. F, GIMENES, D. T, RICHTER, E. M, MUNOZ, R. A.; Fast an direct determination of buty lated hydroxylanisole in biodiesel by bath injection analysis with amperometric detection. **Talanta** v. 85, p. 1274 - 1278, June 1 2011. ISSN 0039-9140.
- TROJANOWICZ, M.; KOZMINSKI, P.; DIAS, H.; BRETT, C. M. A. Batch-injection stripping voltammetry (tube-less flow-injection analysis) of trace metals with on-line sample pretreatment. **Talanta**, v. 68, n. 2, p. 394-400, Dec 15 2005. ISSN 0039-9140.
- TZANAVARAS, P. D.; ZACHARIS, C. K.; THEMELIS, D. G. Rapid determination of methylxanthines in real samples by high-performance liquid chromatography using the new

FastGradient (R) narrow-bore monolithic column. **Talanta**, v. 81, n. 4-5, p. 1494-1501, Jun 15 2010. ISSN 0039-9140.

WANG, J.; CHEN, L.; ANGNES, L.; TIAN, B. Computerized pipettes with programmable dispensation for batch injection-analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 267, n. 1, p. 171-177, Sep 11 1992. ISSN 0003-2670.

WU, Y.; YE, S.; HU, S. Electrochemical study of lincomycin on a multi-wall carbon nanotubes modified glassy carbon electrode and its determination in tablets. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, n. 3, p. 820-824, Jun 7 2006. ISSN 0731-7085.

XIA, Z.; NI, Y.; KOKOT, S. Simultaneous determination of caffeine, theophylline and theobromine in food samples by a kinetic spectrophotometric method. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4087-4093, Dec 15 2013. ISSN 0308-8146.

YANG, G.; ZHAO, F.; ZENG, B. Facile fabrication of a novel anisotropic gold nanoparticle-chitosan-ionic liquid/graphene modified electrode for the determination of theophylline and caffeine. **Talanta**, v. 127, p. 116-122, Sep 1 2014. ISSN 0039-9140.

YANG, G. J.; WANG, K.; XU, J. J.; CHEN, H. Y. Determination of theophylline in drugs and tea on nanosized cobalt phthalocyanine particles modified carbon paste electrode. **Analytical Letters**, v. 37, n. 4, p. 629-643, 2004 2004. ISSN 0003-2719.

YANG, S.; YANG, R.; LI, G.; LI, J.; QU, Y. Voltammetric determination of theophylline at a Nafion/multi-wall carbon nanotubes composite film-modified glassy carbon electrode. **Journal of Chemical Sciences**, v. 122, n. 6, p. 919-926, Nov 2010. ISSN 0253-4134.

YANG, Y. J.; LI, W. High sensitive determination of theophylline based on manganese oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotube nanocomposite modified electrode. **Ionics**, v. 21, n. 4, p. 1121-1128, Apr 2015. ISSN 0947-7047.

YIN, H.; MENG, X.; SU, H.; XU, M.; AI, S. Electrochemical determination of theophylline in foodstuff, tea and soft drinks based on urchin-like CdSe microparticles modified glassy carbon electrode. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1225-1230, Sep 15 2012. ISSN 0308-8146.

YU, L. L.; CHÃO, C. K.; LIAO, W. J.; TWU, T. Y.; LIU, C. M.; YANG, T. H.; LIN, E. T. Determination of clindamycin in human plasma by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry: application to the bioequivalence study of clindamycin. **Journal of Chromatography B**, v. 724, n. 2, p. 287-294, Mar 19 1999. ISSN 0378-4347.

ZEN, J. M.; YU, T. Y.; SHIH, Y. Determination of theophylline in tea and drug formulation using a Nafion (R)/lead-ruthenium oxide pyrochlore chemically modified electrode. **Talanta**, v. 50, n. 3, p. 635-640, Oct 1999. ISSN 0039-9140.

ZHANG, Z.; HU, Z.; ZHANG, H.; YAO, S. Novel layer-by-layer assembly molecularly imprinted sol-gel sensor for selective recognition of clindamycin based on Au electrode decorated by multi-wall carbon nanotube. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, n. 1, p. 158-164, Apr 1 2010. ISSN 0021-9797.

ZI, L.; LI, Y.; MAO, Y.; YANG, R.; QU, L. High sensitive determination of theophylline based on gold nanoparticles/L-cysteine/Graphene/Nafion modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 78, p. 434-439, Sep 1 2012. ISSN 0013-4686.

ZUO, Z.; WO, S. K.; LO, C. M. Y.; ZHOU, L.; YOU, J. H. S. Simultaneous measurement of S-warfarin, R-warfarin, S-7-hydroxywarfarin and R-7-hydroxywarfarin in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 52, n. 2, p. 305-310, Jun 5 2010. ISSN 0731-7085.